

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

**Avaliação Microbiológica do Leite Humano Ordenhado a
Domicílio e Processado em um Banco de Leite Humano**

Renata Prado Sousa

**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
Dezembro-2000**

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

**Avaliação Microbiológica do Leite Humano Ordenhado a
Domicílio e Processado em um Banco de Leite Humano**

Renata Prado Sousa

MS. 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
Dezembro-2000**

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

**Avaliação Microbiológica do Leite Humano Ordenhado a
Domicílio e Processado em um Banco de Leite Humano**

Renata Prado Sousa

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM ___/___/00 NOTA: _____

**Daise Aparecida Rossi
(Orientadora)**

**Ângela Maria Morais Oliveira
(Co-Orientadora)**

**Angela Maria Abdalla H. Beicher
(Co-Orientadora)**

**Uberlândia-MG
Dezembro-2000**

*"Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Cada um de nós compõe a sua história
E cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz..."*

Almir Satter

AGRADECIMENTOS

A Deus,

"Senhor, na alegria da vitória sinto-te mais forte e, em agradecimento por Tua presença em todas as circunstâncias e por tantas bênçãos recebidas, Ofereço a Ti o meu futuro."

À Família,

A vocês que compartilharam os meus ideais, incentivando-me a prosseguir na jornada, quaisquer que fossem os obstáculos e revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação.

A Daise,

"Se não morre aquele que escreve um livro ou planta uma árvore, com mais razão não morre o educador, que semeia a vida e escreve na alma..."

A Ângela Maria de Moraes,

Os meus sinceros agradecimentos pela paciência, respeito e apoio para que minha conquista se concretizasse.

A Ângela Maria A. H. Beicher,

Pela compreensão e disponibilidade durante a realização deste trabalho.

A Jupyys, Fran, Val, Fernanda e Bruno,

E aprendi que se depende sempre de tanta, muita, diferente gente .

Toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de tantas outras pessoas.

E é tão bonito quando a gente sente que a gente é tanta gente onde quer que gente vá ...

E é tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho ,por mais que pense estar...

E é tão bonito quando a gente pisa firme nessas linhas que estão na palma de nossas mãos.

E é tão bonito quando a gente vai à vida nos caminhos onde bate mais forte o coração!

A Liana, Soninha, Odécio e Francesca ,

"Na cadeia da vida são todos os elos igualmente valiosos, porque são todos igualmente necessários."

As funcionárias do BLJH,

Por terem compreendido a importância deste trabalho para minha vida profissional.

Ao Zenon, Gismar,

Obrigada, pelo apoio e colaboração durante esta conquista.

Aos amigos da FUNDAE,

Minha homenagem e gratidão pela amizade, carinho, respeito e convívio .

1. INTRODUÇÃO.....	03
2. REFERENCIAL TEÓRICO	04
2.1. Leite Humano.....	04
2.2. Banco de leite humano (BLH).....	05
2.2.1. Coleta, transporte, seleção e classificação do leite humano.....	07
2.2.2. Lavagem, preparo e esterilização dos materiais utilizados.....	08
2.2.3. Acondicionamento, pasteurização e resfriamento.....	08
2.3. Principais microrganismos que podem contaminar o leite humano.....	09
2.3.1. Bactérias mesófilas	09
2.3.2. Enterobacteriaceae.....	10
2.3.3. <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Metodologia analítica.....	13
3.2. Análise Estatística.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1. Quantificação de bioindicadores de contaminação no leite humano.....	17
5. CONCLUSÃO.....	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

RESUMO

Com objetivo de determinar as condições higiênico-sanitárias do leite humano coletado a domicilio e a eficiência do processo de pasteurização, foram coletadas 16 amostras de leite materno ordenhado pela funcionária de um Banco de Leite Humano (BLH) e pela própria doadora, e posteriormente, processado no BLH. As amostras foram analisadas em todas as etapas do beneficiamento adotado no BLH, sendo elas, leite cru, leite cru descongelado, leite pasteurizado e armazenado congelado por 1 mês e descongelado. Foram realizadas contagem de microrganismos mesófilos, enterobacteriaceae e *Staphylococcus* coagulase positivo. As médias das contagens destes microrganismos no leite ordenhado pelas mães foi superior às médias do leite ordenhado pelas funcionárias, contudo, a diferença entre as duas formas de coleta não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O resultados após pasteurização, revelaram que este procedimento contribuiu significativamente ($p < 0,05$) para a redução nas contagens dos microrganismos estudados. De forma geral, o processo utilizado no BLH foi eficiente para garantir a redução da microbiota do leite humano ordenhado a níveis seguros à saúde do lactente. Treinamento constante do pessoal envolvido em BLH e conscientização das doadoras, devem ser implantados na rotina de BLH, assim como monitorização periódica dos equipamentos e utensílios que entram em contato com o leite humano.

Palavras-chaves: Banco de leite humano, pasteurização, bioindicadores de contaminação.

1. INTRODUÇÃO

O leite humano é considerado alimento essencial para o desenvolvimento e crescimento da criança, pelo seu valor nutritivo, melhor digestibilidade, ausência de fenômenos alergênicos e proteção contra infecções, além de estimular o relacionamento afetivo mãe-filho (SERVA *et al.*, 1991). Entretanto, com o processo de urbanização e com a entrada da mulher no mercado de trabalho houve declínio da prática do aleitamento materno em todos os níveis sócio-econômicos. Deste modo, várias medidas foram tomadas com intuito de incentivar o aleitamento materno, dentre elas, a implantação de bancos de leite humano (BLH), que funcionam como um centro especializado, sem fins lucrativos, vinculados a um hospital materno e/ou infantil, responsáveis pelas atividades de coleta até a distribuição do leite, assegurando sua qualidade.

O leite humano ordenhado obtido de doadoras sadias apresenta microrganismos que podem ser decorrentes da contaminação natural do interior das próprias mamas (flora primária) ou originada de agentes externos (flora secundária), como utensílios, equipamentos, manipulação inadequada, dentre outros. Dentre os microrganismos que podem estar presentes, destacam-se as enterobacteriaceae, bactérias mesófilas e *Staphylococcus* coagulase positivo que servem como indicadores de contaminação ou higienização deficientes.

A adoção de um sistema preventivo e dinâmico de controle de qualidade assume particular importância para os BLH, pois reduz os riscos operacionais, garantindo a qualidade do produto e a saúde do lactente. Deste modo, o presente trabalho possui como objetivos avaliar através de análises microbiológicas, as condições higiênico-sanitárias do leite humano coletado a domicilio e a eficiência do processo de pasteurização utilizado em um banco de leite humano da cidade de Uberlândia-MG.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Leite Humano

O leite humano é o alimento mais completo e adaptado às necessidades do recém-nascido. Este fato é reconhecido por órgãos governamentais de vários países, possibilitando à mãe uma licença pós-parto que permita o acompanhamento estreito e eficaz da criança. São muitas as vantagens do leite humano em relação aos leites artificiais, sendo as mais importantes: 1) proteção do recém-nascido contra infecções; 2) proteção contra diarreias graves; 3) diminuição da probabilidade de ocorrência de alergias e eczemas; 4) não apresenta custos adicionais; 5) administrável em qualquer momento sem necessidade de preparação; 6) alimento vivo e perfeitamente adaptado às necessidades da criança; 7) facilita e ajuda a criar uma boa relação emocional entre a criança e a mãe (SERVA *et al.*, 1991).

Quanto à composição, do ponto de vista nutricional, o leite humano fornece qualitativamente todos os aminoácidos essenciais em quantidades adequadas para o recém-nascido (WOISKI, 1995). No referente as gorduras, ele proporciona de 35 a 50 % da ingestão energética diária na forma de gorduras de fácil digestão e absorção, sendo os ácidos graxos livres a maior fonte de energia para a criança. Além disso, as imunoglobulinas A, G, M e D estão presentes no leite humano apresentando propriedades anti-infecciosas, dentre elas, a IgA é a mais importante tanto quanto a sua concentração, quanto em suas características biológicas. A lactose é o carboidrato mais encontrado e fornece aproximadamente 40% das necessidades energéticas. As principais vitaminas presentes são A, B1, B2, B6, B12, C, E, niacina e ácido fólico. Quanto ao seu conteúdo em sais minerais e vitamina K, mesmo que o leite humano possua baixa concentração, ainda

assim, é considerado como o alimento ideal para o lactente e garantia de seu desenvolvimento pleno e integral (PASCHOA, 1997).

O leite humano pode ser classificado como colostro, leite humano de transição e leite maduro. O colostro é o primeiro produto da secreção láctica da nutriz e é secretado, em média, até 7 dias após o parto. Leite humano de transição é o produto intermediário da secreção láctica da nutriz, entre colostro e leite maduro, obtido entre o 7º e 15º dia pós-parto, em média, e o leite humano maduro é a secreção láctica livre de colostro, obtido a partir do 15º dia pós-parto (PASCHOA, 1997).

2.2. Banco de leite humano (BLH)

O desenvolvimento do Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno, 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 em quantidades suficientes à demanda. Motivado por esta situação, o Ministério da Saúde mobilizou esforços que culminaram, dentre outros, na legislação brasileira que regulamenta a Implantação e o Funcionamento de Bancos de Leite Humano (PASCHOA, 1997).

O BLH é um centro especializado obrigatoriamente vinculado a um hospital materno e/ou infantil, responsável pela promoção do incentivo ao aleitamento materno e execução das atividades de coleta, processamento e controle de qualidade do colostro, leite de transição e leite humano maduro, para posterior distribuição, sob prescrição do médico ou de nutricionista.

Um BLH deve estar localizado de forma 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 tranquilo, 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, sendo orientadas a respeitar os seguintes procedimentos:

- (a) Retirar a blusa, sutiã, anéis, pulseiras, relógios e outros objetos que possam veicular contaminação microbiana.
- (b) Lavar as mãos e antebraços, fazendo escovação cuidadosa com uso de sabão e sob água corrente. Deverá ser realizada a limpeza das mamas com gaze embebida em água fervida .
- (c) Secar as mamas e mãos com toalha individual, fechar a torneira com a própria toalha, evitando assim a recontaminação das mãos a partir da torneira.
- (d) Evitar conversar durante a ordenha e utilizar uma máscara sobre o nariz.
- (e) Desprezar os primeiros jatos em um pequeno frasco ou em um pano limpo, para reduzir os contaminantes microbianos e assim melhorar a qualidade sanitária do leite humano ordenhado.

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).

Os manipuladores devem lavar cuidadosamente as mãos com água e sabão, escovando as unhas e friccionando álcool a 70% durante 30 segundos, objetivando reduzir a carga microbiana das mãos. O uso do avental, gorro e máscaras ficam a critério da instituição

2.2.1. Coleta, transporte, seleção e classificação do leite humano.

A coleta representa a primeira etapa na manipulação do leite humano ordenhado, sendo composta por uma série de atividades que vão desde a massagem e ordenha até a pré-estocagem do produto. Durante a coleta, são necessários cuidados de assepsia para que não haja contaminação do leite com microrganismos presentes na parte externa das mamas ou do ambiente. (ALMEIDA *et al.*, 1998).

O leite pode ser ordenhado através de pressão manual ou com auxílio de bombas elétricas ou manuais. As bombas manuais requerem maiores cuidados durante a sua utilização, uma vez que o leite pode entrar em contato direto com a mesma. A coleta pode ser realizada em recintos apropriados localizados nos bancos de leite, em enfermarias, nos postos de coleta ou nas residências. As coletas realizadas em enfermarias e a domicílios demandam um maior rigor quando comparadas às efetuadas em recinto apropriado e exclusivo para este fim, tendo em vista as diferentes formas de contaminação e a maior dificuldade de controle.

Após a ordenha, o leite deve ser transportado ao banco de leite em embalagens adequadas, as quais devem ser acondicionadas em caixas isotérmicas, de modo a manter o leite sob baixas temperaturas, evitando a proliferação dos microrganismos presentes, resultando em um produto de melhor qualidade.

O produto cru ao chegar ao BLH deve ser imediatamente submetido à seleção/classificação e ao tratamento de conservação específico, sendo mantido no refrigerador até que seja submetido à pasteurização, caso contrário, deverá ser estocado cru, nas mesmas condições a que foi submetido desde a coleta, pelo menor tempo possível. Neste caso, deve-se observar que é importante a higienização da parte externa da embalagem para se evitar contaminantes. Além disso, é necessário avaliar as condições de conservação em que o leite se encontra no momento da recepção, verificando se a embalagem é adequada sob o ponto de vista de vedação, tipo de material, entre outros. (ALMEIDA *et al.*, 1998).

2.2.2. Lavagem, preparo e esterilização dos materiais utilizados

O material utilizado deve ser submetido à lavagem em solução detergente preparada na diluição e tempo de permanência estabelecida pelo fabricante, utilizando-se escovas apropriadas para a sua limpeza. Os mesmos devem ser enxaguados em água corrente, secados e separados de acordo com o tipo de esterilização. As escovas para as mãos, as bombas tira-leite e os acopladores de mamas, após a lavagem, devem ser embalados individualmente e autoclavados a 121°C/15 minutos, assim como as embalagens utilizadas para o acondicionamento do leite humano devem ser devidamente esterilizadas (INAN, 1993).

2.2.3. Acondicionamento, pasteurização e resfriamento

No BLH, o leite coletado é acondicionado em embalagens próprias onde será submetido a tratamento térmico e armazenamento. Neste momento, deve ser certificado que os frascos utilizados para o envase foram corretamente esterilizados, descartadas as embalagens que apresentarem sujidades no interior, e observar ainda, o prazo de validade da esterilização. Os produtos que chegarem congelados devem ser submetidos a degelo prévio. Todas as etapas de manipulação devem ser realizadas próxima ao fogo, que pode ser obtido com lamparina a álcool ou bico de Bunsen, evitando desta forma, a contaminação do produto (ALMEIDA, 1986).

A pasteurização do leite pode ser definida como o processo de aquecimento a uma temperatura pré-determinada por um período de tempo suficiente para obtenção de um produto livre de microrganismos indesejáveis ou causadores de doenças (POLLONIO, 1993). No caso do leite humano, esse é submetido a uma temperatura de 62,5°C durante 30 minutos com a finalidade de destruir bactérias e vírus. Após a pasteurização, os frascos devem ser rapidamente resfriados a 4°C, em banho de gelo. Todo leite humano processado

e estocado deve ser obrigatoriamente rotulado, contendo as seguintes informações: classificação, local e data de coleta, condições de pré-estocagem, identificação da doadora, dados sobre o recém nascido e validade.

É vedada a estocagem de leite humano com outros produtos hospitalares. O tipo clássico de estocagem, após o tratamento de pasteurização é o congelamento por até seis meses em freezer, uma vez que o frio atua retardando ou inibindo a multiplicação microbiana. Deve-se efetuar um rigoroso controle de temperatura do freezer para evitar flutuações prejudiciais à manutenção da qualidade do produto. Na prática, as temperaturas situam-se entre -10 a -40°C (ELEMENTOS..., 1999). Quanto a sua distribuição, o leite deve ser distribuído de acordo com os critérios estabelecidos pela portaria 322/88 do Ministério da Saúde. Normalmente, são selecionados como receptores, os lactentes que apresentam uma ou mais das indicações que se seguem: prematuros e recém-nascidos de baixo peso que não sugam; recém-nascidos infectados, especialmente com enteroinfecções; portadores de deficiências imunológicas; portadores de diarreia protraída; portadores de alergia a proteínas heterólogas e outros casos excepcionais a critério médico (ALMEIDA *et al.*, 1998).

2.3. Principais microrganismos que podem contaminar o leite humano

Devido a grande diversidade de microrganismos presentes, geralmente são pesquisados grupos de microrganismos indicadores de contaminação, dentre eles: bactérias mesófilas, *S. coagulase* positiva e enterobacteriaceae.

2.3.1. Bactérias mesófilas

As bactérias mesófilas 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 . Correspondem à grande maioria da microbiota de importância em alimentos, sendo que a contagem desses microrganismos é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A contagem padrão de bactérias mesófilas tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também informações sobre seu tempo útil de conservação. Sua presença em grande número indicam matérias-primas excessivamente contaminadas, limpeza e desinfecção de superfícies ineficientes, 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).

2.3.2. Enterobacteriaceae

Em alimentos, a ocorrência de números elevados de Enterobacteriaceae indicam processamento inadequado ou recontaminação pós-processamento São provenientes de matéria-prima, equipamentos sujos, manipulação sem cuidados higiênicos ou proliferação microbiana devido condições favoráveis de armazenamento que permitem a multiplicação de microrganismos patogênicos ou toxigênicos (PELCZAR *et.al.*, 1996).

Coliformes totais são bactérias da família Enterobacteriaceae, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás quando incubados a 35-37°C por 48 horas. São bacilos Gram negativos e não formadores de esporos, podem ser móveis ou imóveis, são catalase positivo e oxidase negativo. Entende-se por coliformes totais a somatória dos coliformes de origem ambiental com os de origem fecal. Fazem parte deste grupo predominantemente bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destes, apenas a *Escherichia coli* tem como hábitat primário o trato intestinal do homem e animais, sendo que os demais podem ser encontrados também no solo, vegetais e outros. Portanto, presença de coliformes totais no alimento indica contaminação pós-processamento, limpeza e sanificação deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento e estocagem (GUERREIRO, 1984).

Coliformes fecais são representantes do grupo coliforme que apresentam a capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás, quando incubadas à temperatura de 44-45°C. Nessas condições, ao redor de 90% das culturas de *E. coli* são

positivas, enquanto que entre os demais gêneros, apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm esta característica (PELCZAR *et al.*, 1996).). A *Klebsiella* pode estar presente no ser humano, na pele, nasofaringe ou intestino e podem ser reponsáveis por infecções respiratórias ou urinárias, sendo estas infecções mais comuns em indivíduos hospitalizados e fazendo uso de antimicrobianos, podendo a contaminação ser proveniente de instrumentos e alimentos contaminados (MURRAY *et al.*, 1999).

A pesquisa de coliformes fecais ou de *E. coli* nos alimentos fornece com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos, isto ocorre porque a *E. coli* existe exclusivamente no trato gastrointestinal de homens e animais, sendo portanto, utilizado como microrganismo indicador de contaminação fecal (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

SALLES (1992), analisando fórmulas lácteas utilizadas em rotinas de lactários hospitalares em Florianópolis, encontrou dados alarmantes. Comparando os resultados obtidos com os padrões estabelecidos pela ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE HOSPITAIS (1983), das 24 amostras analisadas, 100% ficaram fora deste padrão para mesófilos viáveis, encontrando ainda 54,16% das amostras com presença de coliformes totais e 41,6 % apresentando coliformes de origem fecal.

2.3.3. *Staphylococcus coagulase positiva*

Os estafilococos, dentre os microrganismos Gram positivos, destacam-se como importante grupo, cuja presença se faz observar, sobretudo na pele e mucosas do homem estendendo-se, de forma generalizada, a animais de sangue quente (PEREIRA *et al.*, 1999). Estes microrganismos são capazes de metabolizar na superfície da pele e mucosas, produtos secretados por glândulas locais, desempenhando com isto papel preventivo na colonização de outros patogênicos (BAIRD-PARCKER, 1994). São representantes da família Micrococaceae e apresentam temperatura de crescimento na faixa de 7°C e 47,8°C.

No que se refere às espécies coagulase positivas, HERRERO *et al.* (1989), isolou além de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* enterotoxigênicos em portadores assintomáticos. É necessário, portanto, admitir a existência de outras espécies além de

S. aureus em manipuladores de alimentos, fator relevante no diagnóstico de intoxicação alimentar, embora, na maioria dos casos de toxinfecção alimentar o *S. aureus* apareça com maior frequência.

Segundo DELAZARI & LEITÃO (1976), este microrganismo secreta uma proteína solúvel em água e de elevada resistência térmica, denominada enterotoxina estafilocócica. Quanto mais baixa a temperatura, maior será o tempo necessário para produção de enterotoxinas. A multiplicação do *S. aureus* e a produção e liberação de enterotoxinas por cepas produtoras estão associadas. Surto epidêmicos ocorrem quando a quantidade de enterotoxina no alimento ultrapassa o limite de resistência do consumidor, desencadeando os sintomas da doença como vômito, diarreia, ânsia, calafrios, dores abdominais, prostração e raramente febre (GELLI & MARTINS, 1986).

S. aureus são bactérias resistentes a muitas drogas e agentes inibidores para outros grupos de microrganismos, facilitando a contaminação e sua multiplicação nos alimentos. Podem sobreviver por muito tempo em ambientes hostis além de apresentar multirresistência a quimioterápicos, antibióticos e metais pesados (ELEMENTOS..., 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 16 amostras de leite humano ordenhado a domicilio, colhidos pela doadora ou pela funcionária do Banco de Leite Humano (BLH). O leite coletado pela funcionária do BLH e pela própria doadora foi separado em 2 grupos distintos, sendo realizado 4 repetições de cada grupo.

Visando verificar a influência dos processos a que o leite doado era submetido, a amostra foi acompanhada dentro da rotina do BLH, que consistia em coleta, refrigeração, reenvase, pasteurização e congelamento. Estas etapas podem ser melhor observadas na Figura 1.

Amostras de leite coletadas nas diferentes fases (sempre acompanhando a mesma doadora) foram conduzidas em caixas isotérmicas com gelo ao Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (LABA-UFU), onde foram analisadas quanto ao número de bactérias mesófilas, enterobacteriaceae e *Staphylococcus*. coagulase positivo.

3.1. Metodologia analítica

Para enumeração das bactérias mesófilas e enterobacteriaceae, foi utilizado a metodologia proposta por VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992), onde 1ml da amostra foi diluída em 9mL de água peptonada tamponada 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

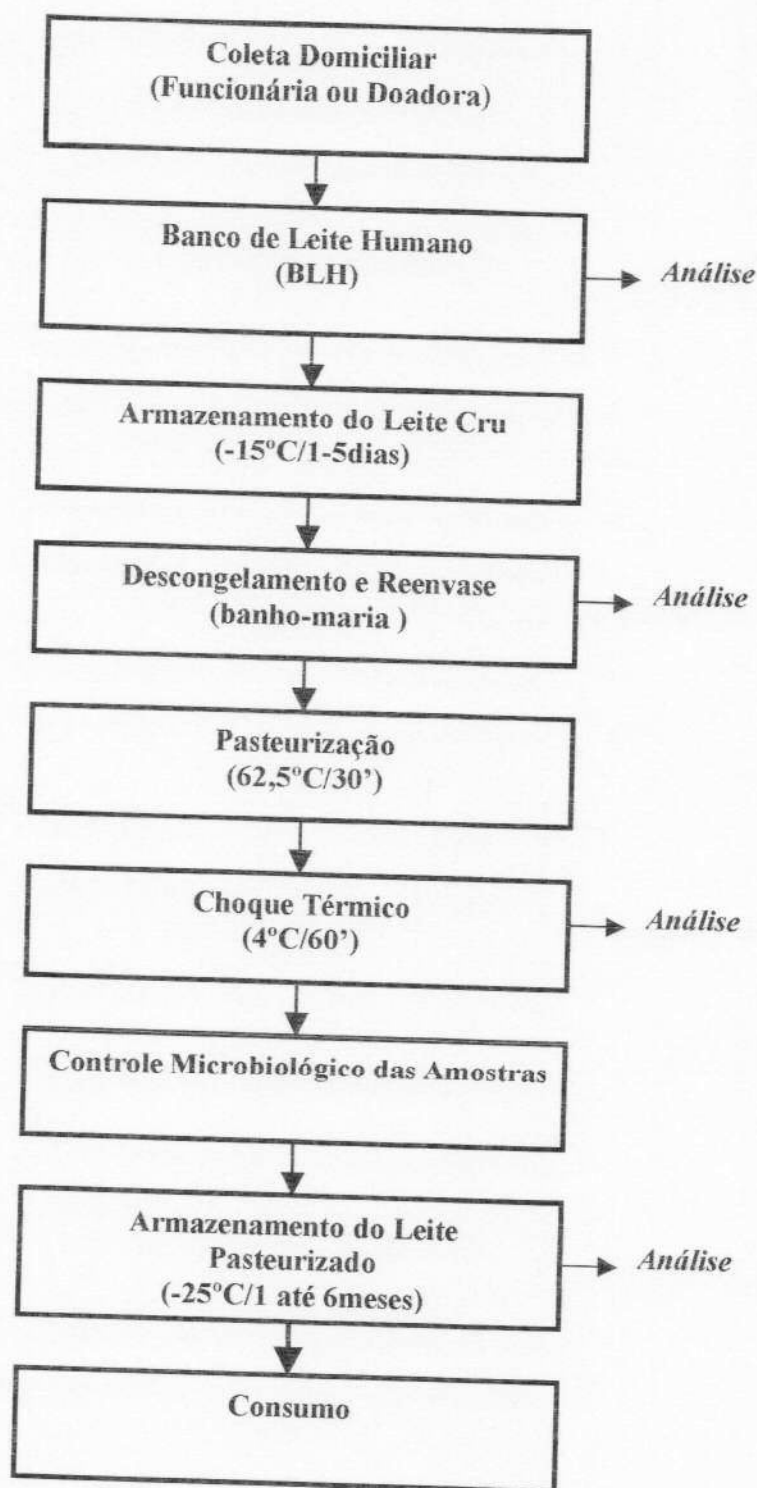


Figura 1: Esquema de condução do experimento.

adicionados 15 mL de agar padrão para contagem (PCA) e ágar azul de metileno (E.M.B), previamente fundidos e resfriados a 45°C, para contagem de bactérias mesófilas e enterobacteriaceae, respectivamente. As placas foram, então, homogeneizadas e após solidificação, incubadas em posição invertida em estufa à 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.

Para a realização da contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo, foi semeado com auxílio de alça de Drigalsk sobre a superfície do ágar Baird Parker, 0,1 mL de cada diluição selecionada. O inóculo foi cuidadosamente espalhado por toda a superfície do meio até ser totalmente absorvido e as placas incubadas em posição invertida a 35-37°C/48 horas. Após incubação, foram selecionadas placas que continham entre 20-200 colônias. Foram contadas e selecionadas colônias típicas (circulares negras, brilhantes, com anel branco opaco rodeado por um halo claro transparente destacando-se sobre a opacidade do meio) e atípicas. As colônias selecionadas foram repicadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e ágar tripticase soja (TSA) inclinado e incubadas a 35°C/24 horas. Nas colônias selecionadas, foram realizadas provas de catalase, Gram e coagulase e confirmadas como *Staphylococcus* coagulase positivas as bactérias que apresentaram resultados positivos em todas as provas. Em seguida foram realizados os cálculos e os resultados expressos como UFC/mL (ABNT, 1991).

Para verificação da presença/ausência de bactérias do grupo coliforme, foi realizada a inoculação direta de 1 mL da amostra em caldos seletivos contendo tubos de Duhran, para coliformes totais e fecais. O caldo utilizado para detecção de coliformes totais foi o verde bile brilhante lactose 2% (VB) e para coliformes fecais, o caldo E.C., incubados por 48 horas a 35°C e 44,5°C, respectivamente. Este procedimento foi baseado no método do número mais provável (NMP) recomendando por (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992). Os resultados foram anotados como presença/ausência de coliformes totais ou fecais/mL.

Dos tubos que apresentaram crescimento no caldo E.C. (bolhas de gás no tubo de Duhran), foi estriado o conteúdo de uma alça de platina em ágar EMB e as placas incubadas a 35°C/24 horas. Após crescimento, foram anotadas as características das colônias, realizado coloração diferencial de Gram e testes bioquímicos, com o objetivo de verificar a espécie de Enterobacteriaceae presente.

3.2. Análise Estatística

O tratamento estatístico dos dados constou da análise de variância, sendo utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial. Para comparação das médias obtidas após os diferentes tratamentos foi utilizado o teste de Tukey a 5% de significância. (SAMPAIO, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas amostras de leite materno obtido através da coleta domiciliar e processado no BLH. A ordenha foi realizada pela própria doadora ou pela funcionária do BLH com auxílio de uma bomba elétrica. O experimento constou de 4 repetições, onde as amostras foram classificadas como leite humano cru, cru descongelado, pasteurizado e pasteurizado armazenado durante 1 mês e descongelado. Todas as amostras foram submetidas a análises microbiológicas para avaliar o grau de evolução ou regressão da microbiota mesófila, de enterobacteriaceae e *Staphylococcus* coagulase positivo.

4.1. Quantificação de bioindicadores de contaminação no leite humano

A amostra classificada como leite cru era aquela que não havia sofrido nenhum tipo de tratamento térmico. Os resultados das análises do leite cru (coletado pela própria mãe e funcionária do BLH) foram registrados em 2 grupos e as médias obtidas comparadas com o objetivo de verificar a influência dos tipos de manipulação na contaminação do leite. Quando foram comparados os resultados obtidos para leite cru ordenhado pela própria doadora com o ordenhado pela funcionária do BLH, observamos que as médias para mesófilas, enterobacteriaceae e *Staphylococcus* coagulase positivo não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). Apesar de não significativas, as médias das contagens destes microrganismos no leite ordenhado pelas mães foi superior às médias do leite ordenhado pelas funcionárias do BLH (Figura 1).

Provavelmente, a não significância estatística desta diferença é devido ao alto coeficiente de variação observado nas contagens, que foi de 59.12%, 77.01% e 74.36%, para bactérias mesófilas, enterobacteriaceae e *Staphylococcus* coagulase positivo, respectivamente.

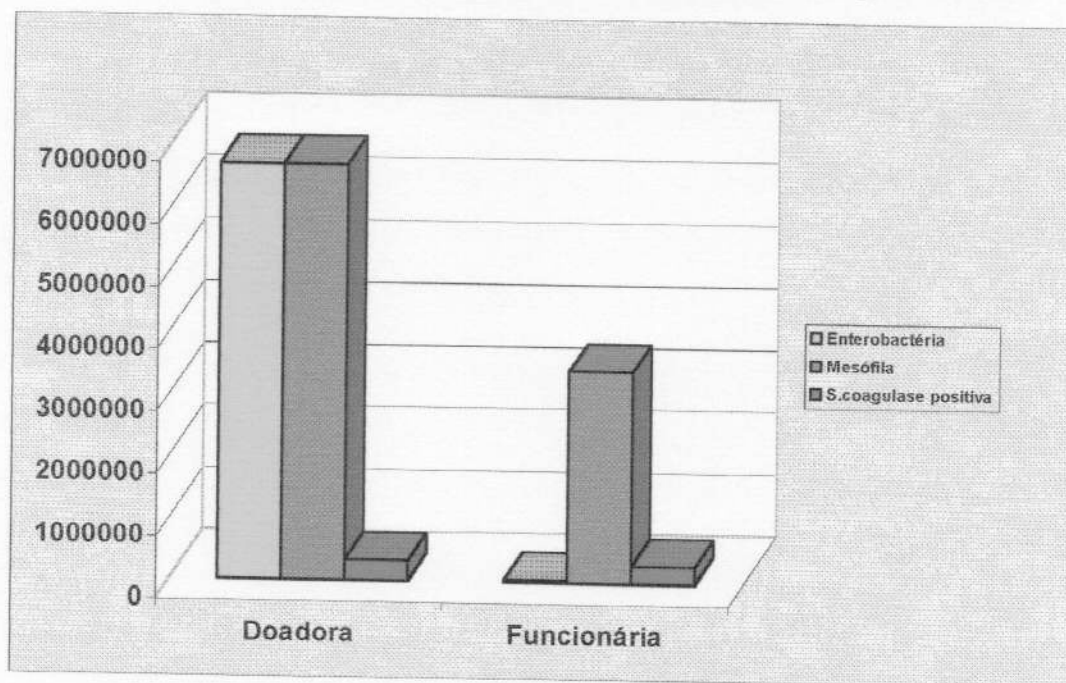


Figura 1. Contagem média de bioindicadores de contaminação no leite humano ordenhado pela doadora e por funcionários de BLH.

O elevado índice de microrganismos no leite cru ordenhado pela doadora pode estar relacionados com falhas durante a coleta do produto, como deficiente sanitização dos utensílios, e higienização pessoal precária, principalmente das mãos e mamas durante a ordenha. Nas coletas realizadas pela funcionária do BLH eram utilizados equipamentos ou materiais de proteção recomendados por ALMEIDA et al (1998), como luvas, gorro, máscara e material estéril.

Não existe um padrão para contagens desses bioindicadores no leite materno cru, porém, nos resultados obtidos observa-se contagens muito altas se comparadas com padrão para bactérias mesófilas em leite de vaca tipos A e B crus, que é de no máximo $1,0 \times 10^4$ UFC/mL para o leite A e $5,0 \times 10^5$ UFC/mL para o leite B (BRASIL, 1997).

A presença de coliformes totais ou fecais só foi detectada em 7 amostras de leite cru, sendo positivo em 6 amostras do leite coletado pela doadora e 1 ordenhado pela funcionária. As provas bioquímicas realizadas (citrato+, indol-, vermelho de metila+, Voges Proskauer-, malonato+, ornitina descarboxilase-), classificaram todos os microrganismos isolados como *Klebsiella* sp., não havendo identificação de *E. coli* em nenhuma amostra que apresentou presença de gás a 44,5°C. Dentre as bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, quando amostras de alimentos são incubadas a temperaturas de 44-45°C em caldos seletivos ou semi-seletivos, a *E. coli* é considerada como a espécie mais provável a ser identificada quando há crescimento, sendo que nessas condições, ao redor de 90% das culturas de *E. coli* são positivas. Entre os demais gêneros, apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella*, identificada no presente trabalho, mantém esta característica (PELCZAR *et al.*, 1996). A *Klebsiella* pode estar presente no ser humano, na pele, nasofaringe ou intestino e podem ser responsáveis por infecções respiratórias ou urinárias, sendo estas infecções mais comuns em indivíduos hospitalizados e fazendo uso de antimicrobianos, podendo a contaminação ser proveniente de instrumentos e alimentos contaminados (MURRAY *et al.*, 1999).

Como rotina do BLH, o leite cru recém ordenhado é congelado à -15°C /1-5 dias, até ser pasteurizado, quando é então, previamente descongelado. Houve redução significativa na contagem de bactérias mesófilas e *Staphylococcus* coagulase positivo após descongelamento, indicando que este tratamento, pode diminuir a contaminação, porém a redução no número de Enterobacteriaceae não foi significativa (Tabela 1).

Tabela 1. Contagem média* de biondicadores de contaminação presentes no leite humano ordenhado e processado no BLH.

Leite materno	Contagem de microrganismos (UFC/mL)		
	Enterobacteriaceae	Mesófilas	<i>S. coagulase positivo</i>
Cru	8,0x10 ⁶ a	1,1x10 ⁷ a	2,9x10 ⁵ a
Cru Descongelado	3,0x10 ⁶ a	6,4x10 ⁶ b	2,5x10 ⁶ b

*média de 12 amostras

a,b – médias na mesma coluna são significativamente diferentes (p<0,05)

A redução nas contagens após descongelamento, é provavelmente devido, à injúria pelo frio, entretanto, deve-se observar que somente o congelamento não é suficiente para assegurar qualidade higiênico-sanitária satisfatória à alimentos (ALMEIDA *et al.*, 1998). Esta observação é particularmente importante no caso de leite materno processado em BLH, sendo a pasteurização, essencial para garantir a inocuidade do alimento .

As médias obtidas após pasteurização, mostrou que este procedimento contribuiu significativamente ($p < 0,05$) para a redução nas contagens de bactérias mesófilas, enterobacteriaceae e *Staphylococcus* coagulase positivo. Apesar da redução significativa, a pasteurização não foi suficiente para atingir os padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde para bactérias mesófilas, que é de no máximo 10^1 UFC/mL, com tolerância em análises de 5 amostras diferentes, de uma amostra com até 10^2 UFC/mL. A média geral obtida para mesófilas após pasteurização foi de $4,2 \times 10^2$ UFC/mL, sendo que das 12 amostras analisadas, somente 4 apresentavam-se dentro da contagem máxima pré estabelecida pelo Ministério da Saúde de até 10^1 UFC/mL. O processo de pasteurização foi eficiente para garantir a ausência de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positivos em 1mL de leite, já que estes microrganismos não foram detectados em nenhuma das amostras de leite pasteurizado analisado, encontrando-se portanto, dentro dos padrões do Ministério da Saúde, que determina sua ausência, sem nenhum tipo de tolerância. Apesar de não haver padrão para contagem de enterobacteriaceae no leite humano pasteurizado, sua contagem foi realizada, sendo obtida uma média de $1,6 \times 10^1$ UFC/mL.

A presença de microrganismos da família Enterobacteriaceae e as contagens de mesófilas em números maiores que os permitidos pela legislação no leite pasteurizado, pode estar relacionado com deficiente higiene na produção, bem como tempo/temperatura de pasteurização insuficientes, como sugere GUERREIRO (1984), porém, as médias obtidas nos 2 tipos de ordenha (doadora ou funcionária) e a contaminação final do leite apresentou diferença não significativa ($p > 0,05$). As médias das contagens de bactérias mesófilas foi de $3,5 \times 10^2$ UFC/ml para o leite coletado pela funcionária e $4,9 \times 10^2$ para o leite coletado pela doadora.

Após a pasteurização, o leite humano permanece congelado (-25°C) por até 6 meses, dependendo da necessidade. Para padronização do experimento, análises foram realizadas após 1 mês de congelamento. Nos resultados obtidos após análise do leite armazenado durante 1 mês em todas as contagens de todas as repetições não foi observado a presença de nenhum dos microrganismos analisados. Este resulta demonstra que a microbiota existente pós-pasteurização pode ser inibida e até mesmo eliminada no processo de congelamento (ELEMENTOS..., 1999). Todas as amostras analisadas estão dentro dos padrões do Ministério da Saúde quando analisadas após o descongelamento. Devido aos bons resultados na destruição da microbiota remanescente pelo processo de congelamento, este equipamento (freezer) deve ser monitorado periodicamente, principalmente quanto à manutenção da temperatura, de forma a garantir os bons resultados alcançados.

Os efeitos dos processos utilizados no BLH estudado sobre a microbiota do leite humano pode ser melhor observado através dos resultados das contagens realizadas nas diferentes etapas. (Figura 2).

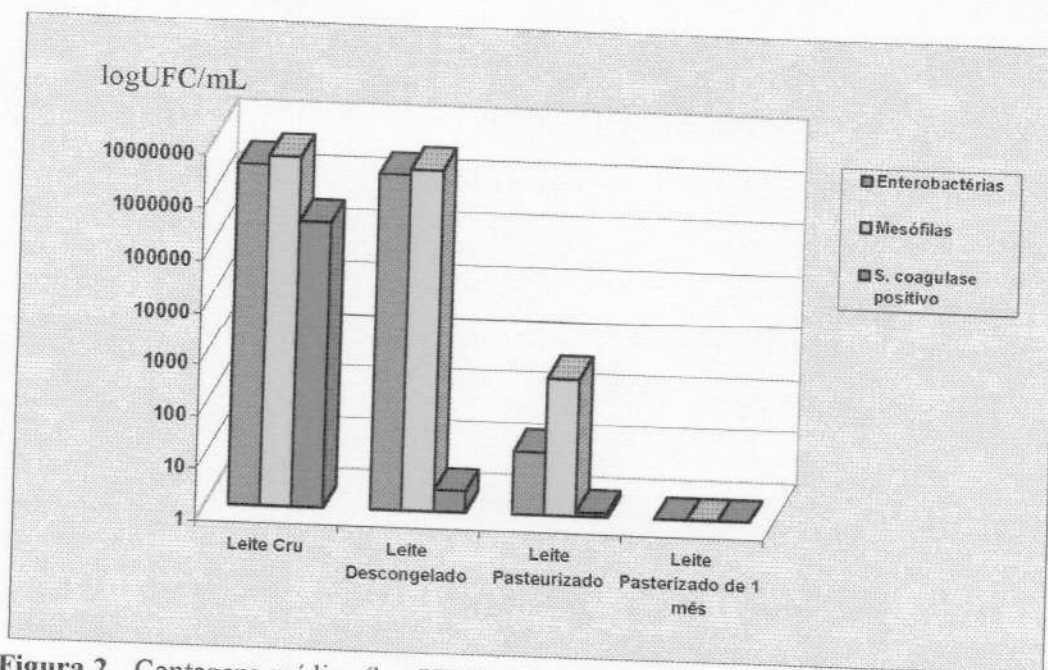


Figura 2. Contagens médias (log UFC/mL) de bioindicadores de contaminação diferentes fases de processamento do leite humano ordenhado e processado no BLH.

5. CONCLUSÃO

As análises microbiológicas de contagem de mesófilas, enterobacteriaceae e *Staphylococcus* coagulase positivo utilizadas para determinar as condições higiênico-sanitárias de 16 amostras de leite humano obtidas através da coleta domiciliar e a eficiência do processo de pasteurização permitem concluir que :

- As médias das contagens destes microrganismos no leite ordenhado pelas mães foi superior às médias do leite ordenhado pelas funcionárias, contudo, as diferenças foram não significativas ($p > 0,05$).
- A pasteurização contribuiu significativamente ($p < 0,05$) para a redução nas contagens desses microrganismos;
- De forma geral, o processo utilizado no BLH estudado foi eficiente para reduzir a contaminação do leite humano ordenhado a níveis não prejudiciais à saúde do lactente. BLH devem promover monitorização periódica dos equipamentos e utensílios que entram em contato com o leite materno, treinamento de todo pessoal envolvido no processamento e conscientização das doadoras.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Contagem de *Staphylococcus aureus* em placa.** MB3464. 1991.
- ALMEIDA, J.A.G. NOVAK, F. R., ALMEIDA, C. H. G. CHAVES, C. **Recomendações Técnicas para Funcionamento de Banco de Leite Humano.** Brasília. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição – INAN – Ministério da Saúde, 1998. 48p.
- ALMEIDA, J.A.G. Qualidade do Leite Humano coletado e Processado em Bancos de Leite. **Imprensa Universitária**, Viçosa, 1986. 69p.
- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE HOSPITAIS. Funcionamento e planejamento do lactário. São Paulo, 1983.
- BAIRD-PARKER, A. C. Foods and microbiological risks. **Microbiology**. 1994, v.140, p.687-695.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria 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.
- DELAZARI, I., LEITÃO, M.F.F. *Staphylococcus aureus* enteropatogênico em macarrão. **Col. Instituto Técnico de Alimentos**, 1976, n.7, p.495-497.
- ELEMENTOS de Apoio para o Sistema APPCC. **Qualidade de Segurança Alimentar.** Brasília, SENAI, 1999. 370 p.
- FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996. 170p.
- INAN – Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição. **Recomendações Técnicas para Funcionamento de Banco de Leite Humano.** 2.ed. Brasília, 1993.
- GELLI, D.S., MARTINS, M.C. *Staphylococcus aureus* produtor de termonuclease em alimentos. **Rev. Instituto Adolfo Lutz**, n.1/2, vol. 46, 1986. p.103-109.
- GUERREIRO, M.G. Bacteriologia Especial: com interesse à saúde pública. Porto Alegre: Sulina, 1984, 205p.

- HERRERO, F; HYROOKA, E. Y; SILVA, N. S. Isolamento de *S. hyicus* enterotoxigêncio em portadores humanos sãos. **Rev. Microbiol.** 1989, nº. S1, v. 20, p.63. Resumo.
- MURRAY, P. R., BARON, E. J., PFALLER, A. M., TENOUER, F. C., YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**, 7. ed, Washington, 1999. 475-482p.
- PASCHOA, M.F. Pasteurização do leite materno: vantagens e desvantagens. **Rev. Higiene Alimentar**, 1997. nº.50, v.11, p.14-19.
- PELCZAR Jr, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R.. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. Volume II, 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 521p.
- PEREIRA, M. L., SERRANO, A. M., BERGDOLL, M. S. Estafilococos e Alimentos: Possibilidades de disseminação através do portador humano e animal. **Rev. Higiene Alimentar**, 1999. nº. 66/67, v.13, p.48-55.
- POLLONIO, M.A.R. **Tecnologia de Alimentos para o Curso de Nutrição**. São Paulo: Catálise Editora, 1993.
- SALLES, R. K. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias de lactários hospitalares no município de Florianópolis-SC. **Dissertação de mestrado em ciências dos alimentos** – Centro de Ciências Agrárias, UFSC. Florianópolis. 1992.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 1.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SERVA, V.B., ROLIM, E.G., ALBUQUERQUE, M.R.G. **Avaliação da Qualidade Microbiológica do Leite Humano do Banco de Leite Humano (BLH)/ Centro de Incentivo ao Aleitamento Materno (CIAMA) Instituto Materno Infantil de Pernambuco** – IMIP, n.1, v.5, 1991. p30-34.
- VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. **Compedium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.
- WOISKI, J. R. **Nutrição e Dietética em Pediatria**. 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 1995, 57-62p.