

Estudo comparativo entre a prova da fosfatase alcalina e a análise microbiológica de leite humano processado em banco de leite do Recife – PE

Comparative study between the test of the alkaline fosfatase and the microbiological analysis of human milk processed at milk bank of Recife - PE

Elma Freitas do Nascimento¹ & Maria do Rosário de Fátima Padilha²

RESUMO - O leite materno pasteurizado nos Bancos de Leite Humano passa pelo controle de qualidade microbiológico, a fim de disponibilizar um leite isento de contaminação. Outro método é a prova da Fosfatase Alcalina: enzima totalmente inativada durante a pasteurização. Na escolha de um novo método, algumas considerações devem ser seguidas, como: condições ideais de análise, custo, tempo de análise e complexidade do método. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo comparar a eficiência da análise da Fosfatase Alcalina com a microbiológica para, avaliar a qualidade do leite materno pasteurizado no Banco de Leite Humano do Hospital Agamenon Magalhães. Setenta e cinco amostras foram coletadas em vidros estéreis, sendo realizados ensaios em triplicata, atingindo um total de 225 análises: 25 amostras de leite cru para controle do teste da Fosfatase Alcalina; e 50 amostras de leite pasteurizado, sendo metade empregada para cultura microbiológica e metade para análise de detecção da Fosfatase Alcalina em leite. Os resultados evidenciaram, em ambas as análises, pasteurização adequada. No entanto, a análise da FA, mostrou ser um método simples, prático, rápido e de menor custo quando comparado à análise microbiológica, o que facilita sua adoção pelos Bancos de Leite Humano.

PALAVRAS-CHAVE - Banco de Leite, Pasteurização, Fosfatase Alcalina, Leite Humano.

SUMMARY - The pasteurized mother milk in the Human Milk Banks passes for the microbiological quality control, in order to dispose a milk exempt of contamination. Another method is the test of the Alkaline Fosfatase: enzyme totality inactivated during the pasteurization. In the choice of a method some considerations must be followed, as: ideal conditions of analysis, cost, time of analysis and complexity of the method. Being thus, this work had for objective to compare the efficiency of the analysis of the Alkaline Fosfatase with the microbiological one to evaluate the quality of pasteurized mother milk in the Human Milk Bank of the Hospital Agamenon Magalhães. Seventy and five samples had been collected in barren glasses, being realized assays in third copy, reaching a total of 225 analyses: 25 of raw milk for control of the test of the Alkaline Fosfatase; and 50 of pasteurized milk, being half for microbiological culture and half for analysis with piece for detention of Alkaline Fosfatase in milk. The results evidenced in both analyses adequate pasteurization. However, the analysis of the FA showed to be a simple method, practical, fast e of lesser cost when compared with the microbiological analysis, what it facilitates its adoption for the Human Milk Banks.

KEYWORDS - Milk bank, Pasteurização, Alkaline Fosfatase, Human Milk.

INTRODUÇÃO

Amamentação, além de aumentar o vínculo afetivo mãe-filho, evita a contaminação do leite materno, pois o produto vai direto da fonte, o peito, ao consumidor, o bebê¹⁷. No entanto, alguns recém-nascidos, geralmente prematuros e/ou baixo peso, podem estar impossibilitados clinicamente de mamar; então, se faz necessária à ordenha deste leite. Para oferecer uma melhor qualidade do leite ordenhado oferecido a estes bebês foram criados os Bancos de Leite Humanos – BLH¹².

A Rede Nacional de Banco de Leite Humano – REDE BLH¹² - define BLH como “responsável pela promoção e incentivo ao aleitamento materno e execução das atividades de coleta, processamento e controle da qualidade do colostro, leite de transição e leite humano maduro, para posterior distribuição”. Hoje, o Brasil comporta 175 Bancos de Leite Humano, sendo 34 destes localizados no Nordeste, dos quais apenas 9 estão em Pernambuco, que compreende: Hospital Agamenon Magalhães (HAM), Hospital Barão de Lucena (HBL), Hospital de Ávila, Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC), Hospital Dom Malan, Hospital Esperança, Hospital Jesus Nazareno, Instituto Materno Infantil (IMIP) e Maternidade Professor Monteiro de Moraes (CISAM)¹².

Dentre os serviços acima citados, destacam-se o IMIP, que é um Centro de Referência Nacional em Aleitamento e pri-

meiro do Brasil a receber o título de Hospital Amigo da Criança em 1992⁹⁷ e o HAM que, além de possuir o título de Hospital Amigo da Criança desde 1995, é responsável pelo processamento do leite ordenhado in loco, como também de amostras do Hospital Bandeira Filho e da Maternidade Barros Lima. Estes dois últimos hospitais não possuem BLH, apenas Postos de Coleta de Leite Materno. Nos Bancos de Leite, o leite materno, após ordenha asséptica e num prazo máximo de 15 dias a partir de sua coleta, deve ser pasteurizado e passar por um rigoroso controle da qualidade, a fim de disponibilizar um produto com alto valor nutritivo e isento de contaminação⁰¹.

Segundo Costa⁰⁴, a pasteurização é o tratamento aplicado ao leite humano, que visa a inativação térmica de 100% das bactérias patogênicas e 90% de sua flora saprófita, através do binômio temperatura/tempo de 62,5°C durante 30 minutos, baseado na inativação térmica da *Coxiella burnetti*.

No que se refere à análise do leite pasteurizado, segundo a Rede BLH12, “o cultivo dos indicadores deve ser simples, economicamente viável e seguro, minimizando a possibilidade de resultados falso-positivos”. Por este motivo, novos métodos são propostos e alguns aceitos ao se enquadrarem nestas exigências.

Atualmente, o controle da qualidade do leite humano é realizado através da análise microbiológica proposta por Novak e Almeida¹⁰, utilizada, desde então na rotina dos

Recebido em 25/11/2008

Aprovado em 08/02/2010

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Agamenon Magalhães em reunião realizada em 25 de agosto de 2005.

¹Especialização em Análises Clínicas pela Faculdade Frassinetti do Recife e Responsável por Análise de Leite Humano do Hospital Agamenon Magalhães.

²Doutora em Ciências dos Alimentos e Professora Assistente da Universidade Federal Rural de Pernambuco

Bancos de Leite do país, que verifica a presença ou ausência de coliformes totais no leite pasteurizado através de cultura em Caldo Verde Bile Brilhante Lactose por 48 horas em estufa. Anteriormente a esta, o método usado era do Número Mais Provável (NMP) de coliformes¹⁰. Por outro lado, Behmer⁰³ sugeriu outra análise para garantir a qualidade do leite em escala industrial: a prova da enzima Fosfatase Alcalina.

As enzimas são substâncias capazes de acelerar reações químicas sem serem consumidas nem compor no produto final da reação, sendo inativadas ou decompostas pela ação de ácidos e bases fortes, certos tóxicos ou pelo calor⁰⁵. A Fosfatase Alcalina, enzima termossensível, está presente em praticamente todos os tecidos do organismo, sendo a óssea e a hepática muito conhecidas clinicamente^{06,11}. Esta enzima catalisa a hidrólise de ésteres fosfóricos que, dentre outras funções, auxiliam na mineralização óssea^{09,11}.

No leite cru, a fosfatase alcalina está sempre presente e é totalmente destruída em aquecimento e temperaturas ótimas^{03,13,14,16}. Com base nesta informação, em 1933, Kay e Graham sugeriram a primeira reação de fosfatase no leite^{03,14,16} para verificar a eficiência da pasteurização. Segundo estes autores e VARNAM e SUTHERLAND¹⁵, ela é totalmente inativada a uma temperatura de 62°C por 30 minutos.

A primeira prova de Fosfatase Alcalina baseava-se em incubar o leite com "fenil fosfato dissódico", liberando fenol e a cor produzida era comparada com o comparador de Lovibond, que não poderia exceder 2,3 unidades azuis de Lovibond^{03,14}.

Segundo Vilas¹⁶, até 1960 a prova de Kay e Graham foi utilizada como a prova oficial de fosfatase, sendo depois substituída pela reação, mais rápida, de Aschaffenburg e Mullen – modificada por Tramer e Wight em 1963 – usada oficialmente para leite pasteurizado em escala industrial. Esta reação consiste em incubar de 1 a 5 mL de leite em para-nitrofenil-fosfato dissódico, devidamente tamponado, por 2 horas em 37/38°C. Se houver fosfatase, a solução apresentará uma cor amarela, devido a formação de nitrofenol, que deve ser comparada ao disco de Lovibond, graduado em µg de para-nitrofenol/mL de leite. O resultado deve ser menor ou igual a 10 µg de para-nitrofenol/mL.

Por outro lado, Behmer⁰³ enfatiza que esta prova pode durar de 30 minutos, prova rápida, a 24 horas, prova lenta. Atualmente, existem métodos bem mais rápidos e seguros, como, por exemplo, as tiras de Fosfatase Alcalina (gráfico 1). Essas tiras utilizam o mesmo princípio da reação oficial para a indústria de leite, sendo mais rápidas e fáceis de visualização. Varnam e Sutherland¹⁵ descrevem as análises realizadas nos diversos tipos de leites de vaca em escala industrial e os testes enzimáticos, inclusive a prova da fosfatase alcalina, é obrigatória para estes leites.

Segundo Schönherr¹³, qualquer tipo de pasteurização destrói a fosfatase láctea e, por isso, a análise por esta enzima, pode ser utilizada para verificar a higiene do leite submetido a este processo.

Como caracteriza Torre¹⁴, a prova da fosfatase alcalina, pela sua facilidade e rápida execução, constitui um elemento fundamental de análise precoce de uma boa pasteurização. Mesmo com vantagens de execução rápida e eficaz, a prova da fosfatase alcalina, ainda não é aplicada na avaliação do leite humano. Diante do exposto, surgiu a necessidade de comparar a análise microbiológica e a prova da fosfatase, cujo objetivo comum, visa verificar a eficiência da pasteurização e avaliar as vantagens deste novo método para a qualidade do leite humano oferecido em Banco de Leite Humano do Recife.

Amostras de 200 mL de leite materno foram coletadas em vidros estéreis, no Banco de Leite Humano do Hospital Agamenon Magalhães, de nutrizas doadoras, com no máximo dez dias de pós-parto, durante o período de setembro de 2005 a abril de 2006.

Para a seleção físico-química dos leites, foram usados os padrões de acidez e crematócrito afixados nas normas da ANVISA⁰¹: com acidez menor ou igual a 8°D (graus Dornic) e com crematócrito maior ou igual a 250Kcal/L, respectivamente.

O tamanho amostral foi de 75 amostras, nas quais foram realizadas em triplicata, num total de 225 análises, distribuídas em três grupos: Grupo A (controle), com 25 amostras de leite cru para testar a eficiência do kit da Fosfatase Alcalina (tiras) e provar que as amostras cruas continham Fosfatase Alcalina; Grupo B, constituído de 25 amostras de leite pasteurizado para análise microbiológica e Grupo C, com 25 amostras de leite pasteurizado para análise da Fosfatase Alcalina.

As amostras de leite cru foram submetidas à seleção inicial recomendada e, após, colhidas alíquotas de 5 mL em tubos de ensaio estéreis com o auxílio de pipetas estéreis. A seguir, as amostras do Grupo A foram pasteurizadas no Banco de Leite, conforme normas do Ministério da Saúde¹², sendo, em seguida, colhidas duas amostras: uma para o Grupo B e a outra para o Grupo C.

Do total de amostras do Grupo B, 50 foram enviadas ao Laboratório Central Julião e as 25 restantes, ao Laboratório Central do Estado (LACEN), conforme prática usual neste hospital.

1. Determinação microbiológica

A análise microbiológica de leite humano utilizando Caldo Verde Brilhante segue as normas afixadas pela ANVISA⁰¹, baseada no estudo de Novak e Almeida¹⁰, o qual consiste em incubar 4 mL de leite pasteurizado em meio de cultivo com Caldo Verde Bile Brilhante Lactose.

O Caldo Verde Bile Brilhante Lactose foi preparado na concentração de 50g para cada litro de água recém-destilada, distribuído em tubos de ensaio contendo tubo de Durhan – 10mL em cada tubo – e autoclavado a 121°C por 15 minutos. A seguir, acrescentou-se 4mL da amostra a ser analisada e incubou-se a 36°C ±1°C por 24 a 48 horas. A presença ou ausência de gás no tubo de Durhan indica, respectivamente, teste positivo ou negativo para coliformes. Nos casos positivos, o resultado era confirmado através de nova inoculação, em tubos de 40g/L de água recém-destilada, desta amostra com o auxílio de uma alça de platina e incubadas novamente a 36°C±1°C por 24 a 48 horas.

2. Determinação da Fosfatase Alcalina

Para a realização da prova da enzima Fosfatase Alcalina no leite foram utilizadas tiras reagentes da Laborclin⁰⁸ – kit da prova de Fosfatase Alcalina no leite, em tiras, Cód. 917000, Lote 50815014 -, onde se adicionou 1 mL da amostra em um tubo de ensaio, o suficiente para imergir a parte reagente da tira, aguardar 2 a 3 minutos e, a seguir, realizar a leitura. Nos casos negativos, as tiras foram incubadas em estufa por uma hora, a 37°C, a fim de confirmar o resultado. Foi considerado resultado positivo (presença da enzima), quando a parte reagente da tira apresentou coloração amarela, e negativo (ausência da enzima) quando não apresentou coloração ou uma coloração amarelo-pálida.

Análise estatística

Os dados obtidos foram comparados e avaliados estatisticamente pelo teste do qui-quadrado (χ^2), com correção de Yates nos casos necessários, para verificar a existência de diferença significativa entre as duas análises.

RESULTADOS

Resultados e Discussão

Os resultados das análises para a fosfatase alcalina estão apresentados na figura 01. No Grupo A, observou-se que em todas as amostras analisadas o resultado foi positivo para a enzima. Isto mostra que o kit se comporta de forma eficaz, pois no leite cru a FA está presente.

Após a pasteurização, todas as amostras dos grupos B e C mostraram resultado negativo (figura 1), indicando que a pasteurização foi realizada com sucesso.

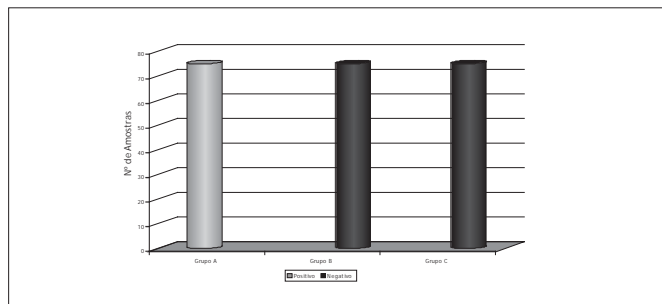


Figura 1. Resultado das análises para a fosfatase alcalina (FA) no leite cru (Grupo A), e no leite pasteurizado (Grupos B e C)

Foi visualizada nítida diferença de coloração do leite cru (grupo A), para o leite pasteurizado (grupo C), positivo e negativo, respectivamente, conforme observa-se na figura 02.

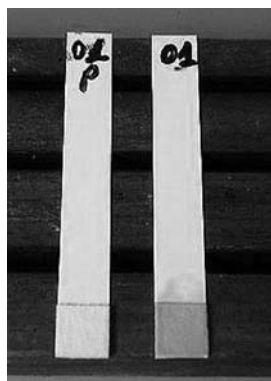


Figura 2. Amostras de tiras de Fosfatase Alcalina. Em cinza, amostra de leite cru, e em pálido, mesma amostra após pasteurização.

Os dados obtidos de ambas as análises, quando submetidos à análise estatística, mostraram um valor do χ^2 de 73,0133, enquanto que o valor crítico para alfa de 1% e 5% é de 6,63 e 3,84, respectivamente. O valor do χ^2 calculado foi maior que o valor do χ^2 tabelado ao nível de significância de 1% e 5%, portanto não há diferença significativa entre ambas as análises.

No que se refere ao tempo de liberação dos resultados, o Laboratório Julião enviou a análise numa média de 13 dias, enquanto que o LACEN, em 26 dias.

DISCUSSÃO

Segundo a REDE BLH¹², o leite humano processado em Bancos de Leite Humano deve passar por rigoroso contro-

le da qualidade, sendo atualmente utilizado o Caldo Verde Brilhante para este controle. No entanto, Behmer⁰³ refere que a Fosfatase Alcalina – FA - é totalmente inativada no leite pasteurizado corretamente, e isto lhe concede a função de ser um indicador de eficácia deste procedimento.

Schönherr¹³ cita que qualquer tipo de pasteurização, da lenta à rápida, é capaz de destruir a fosfatase alcalina e que os microrganismos presentes no leite são destruídos, em geral, mais rapidamente do que a fosfatase. Por isso, ele recomenda que a análise desta substância seja utilizada como regulador do “efeito higiênico” da pasteurização. Neste estudo, comprovou-se que o kit de FA utilizado se comporta de forma eficaz, ao nível de significância de 95%, pois no leite cru a FA deve estar presente^{03,13,14,15,16}, sendo, portanto, detectada em todos os leites crus analisados e ausente nos leites pasteurizados, fato também confirmado em 100% das amostras.

Torre¹⁴, em 1966, já se referia à prova da FA como de fácil e rápida execução, além de ser útil na identificação precoce de um processo adequado de pasteurização. Isso corrobora com um dos objetivos da Rede BLH é expansão dos Bancos de Leite Humano no Brasil¹², para atingir a maior parte da população e reduzir a mortalidade infantil, um método mais rápido, prático e de menor custo, beneficiaria o processamento do leite em unidades menores que precisariam, ou precisam, de mais recursos e equipamentos para sua manutenção.

Neste enfoque, o estudo apresentou diferença significativa entre os métodos. No método usual – Caldo Verde Brilhante, baseado no estudo de Novak e Almeida¹⁰ -, há necessidade de grande quantidade de material, de maior espaço de tempo e de mão-de-obra para preparo do meio de cultura, que tem como passo seguinte incubar por 48hs em estufa. Por outro lado, o método proposto já está pronto para uso, obtendo-se resultado imediato ou em até uma hora – tempo necessário para comprovar o resultado negativo – além de haver sensível redução de material, tempo e mão-de-obra. O método usual, em alguns serviços, necessita ainda de transporte para envio de material aos laboratórios externos, pois este procedimento não é realizado no próprio hospital. No entanto, este novo método pode ser realizado “in loco”, diminuindo também os custos com transporte.

Para a Rede BLH¹², “o cultivo dos indicadores deve ser simples, economicamente viável e seguro, minimizando a possibilidade de resultados falso-positivos”. Portanto, sendo a análise da FA tão eficaz quanto à microbiológica, com a vantagem de ser mais fácil de ser executada e de otimizar tempo e custo, poderia ser aplicada em larga escala, em toda a Rede BLH, em substituição à comumente usada, ou, ainda, ser utilizada como primeira prova para garantir a qualidade do leite pasteurizado, disponibilizado pelos Bancos de Leite Humano.

AGRADECIMENTOS

À Cândida Rodrigues, chefe do Banco de Leite Humano na época do estudo, e à Natália Matsushita, gerente da Patologia Clínica, ambas do Hospital Agamenon Magalhães, por permitirem a execução deste estudo nas dependências dos respectivos serviços. E à empresa Laborclin Produtos para Laboratório LTDA por ceder as tiras de fosfatase alcalina necessárias à realização deste.

REFERÊNCIAS

01. ANVISA. Regulamento técnico para funcionamento de Banco de Leite Humano (BLH). Disponível no site: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 09 jul. 2005.
02. BARROS, V. R. M.; PANETTE, J. C.; PERES, F. M. C. Eficiência do sistema de pasteurização utilizado em usinas de beneficiamento de leite da capital de São Paulo – Brasil. Revista Higiene Alimentar 3: 199-206, 1984.
03. BEHMER, M. L. A. Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvete e instalações. São Paulo, Nobel, 1984.
04. COSTA, M. L. Pasteurização: Garantia de qualidade para doação de leite materno. Disponível no site: <http://www.aleitamento.com/a_artigos.asp?id=9&idartigo=774&id_subcategoria=20>. Acesso em 13 mar. 2005.
05. DEMETER, K. J.; ELBERTZHAGEN, H. Elementos da microbiologia lactológica. Zaragoza, Acribia, 1971.
06. FOSFATASE ALCALINA. 2005. Disponível em: <http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/fosfatase_alcalina.shtml>. Acesso em 12 mar. 2006.
07. IMIP. Banco de Leite Humano. Disponível no site: <<http://www.imip.org.br>>. Acesso em 06 ago. 2005.
08. LABORCLIN. Controle microbiológico de leite. 2006. Disponível em: <<http://www.laborclin.com.br>>. Acesso em 25 mar. 2006
09. MAURO, S. M. Z. D. Genes codificando as fosfatases alcalinas em camarão. 2005. Disponível em: <[http://www.shrimp.ufscar.br/datamining/Sonia\(1\).php](http://www.shrimp.ufscar.br/datamining/Sonia(1).php)>. Acesso em 12 mar. 2006.
10. NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G. Teste alternativo para detecção de coliformes em leite humano ordenhado. Jornal de Pediatria 78: 193-196, 2002.
11. PENIDO, M. G. M. G. Alterações ósseas na hipercalcúria idiopática em crianças e adolescentes. Pediatric Nephrology 18: 133-139, 2003.
12. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano – REDE BLH. Manual técnico. Disponível no site: <<http://www.fiocruz.br/redeblh/index.php?pagina=port/manual/pasteurizacao.htm&men=2&submen=6>>. Acesso em 09 jul. 2005.
13. SCHÖNHERR, W. Manual practico de analisis de leche. Zaragoza, Acribia, 1959.
14. TORRE, G. D. Scienza del Latte: Metodi e tecniche per il risanamento. Bologna, Edagricole, 1966.
15. VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Leche y productos lácteos: tecnologia, química y microbiología. Zaragoza, Acribia, 1995.
16. VILAS, J. M. T. Manual de plantas de pasterización. Zaragoza, Acribia, 1971.
17. VINHA, P. V. H. Amamentação materna: Incentivo e cuidados. São Paulo, Sarvier, 1987.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Elma Freitas do Nascimento
Rua Professora Lourdes Dutra, nº 59, Água-Fria
Cep: 52130-010. Recife – PE.
E-mail: elmafreitas@yahoo.com.br.

TEAC

Título de Especialista em Análises Clínicas

A avaliação prática do
conhecimento em análises clínicas.

Valorize a sua profissão
e sua carreira

Inscreva-se!!!

www.sbac.org.br

Realização:

