



## The correlation between aerobic mesophilic microorganism counts and Dornic acidity in expressed human breastmilk

*Correlação entre população de microrganismos mesófilos aeróbios e acidez Dornic no leite humano ordenhado*

Franz R. Novak<sup>1</sup>, Dea M. B. Cordeiro<sup>2</sup>

### Resumo

**Objetivo:** O estudo foi delineado para testar a existência de correlação entre a população total de microrganismos aeróbios mesófilos e os valores de acidez Dornic no leite humano ordenhado cru processado em banco de leite humano.

**Métodos:** Foram analisadas 200 amostras consecutivas de leite humano ordenhado, em banco de leite humano, antes da pasteurização. A acidez Dornic foi titulada nas amostras em triplicata. A seguir, foi realizada a contagem em placa para microrganismos aeróbios mesófilos. Os dados foram avaliados pela correlação de Pearson entre as variáveis, e o nível de significância foi estabelecido em  $p \leq 0,05$ .

**Resultados:** Os valores de acidez Dornic mostraram correlação positiva ( $R = 0,948$ ) e estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ) com a população de microrganismos aeróbios mesófilos (UFC/mL) nas amostras analisadas.

**Conclusão:** Os dados obtidos permitem concluir que a titulação Dornic é um método eficaz para avaliar indiretamente o crescimento bacteriano no leite humano ordenhado.

*J Pediatr (Rio J). 2007;83(1):87-91: Leite humano, bactérias, acidez.*

### Abstract

**Objective:** The study was designed to test for the existence of a correlation between the total population of aerobic mesophilic microorganisms in processed raw breastmilk from a human milk bank and the Dornic acidity of that milk.

**Methods:** Two hundred consecutive samples of thawed expressed human breastmilk obtained from human milk bank, prior to pasteurization. Dornic acidity was titrated in triplicate for each sample. aerobic mesophilic microorganisms were then plate counted. Data were analyzed to detect correlations between variables, using Pearson's coefficient, and the level of significance was set at  $p \leq 0.05$ .

**Results:** In the samples analyzed, Dornic acidity levels had a positive ( $R = 0.948$ ) and statistically significant ( $p \leq 0.001$ ) correlation with the population of aerobic mesophilic microorganisms (CFU/mL).

**Conclusions:** The data obtained here support to the conclusion that Dornic titration is an effective method for the indirect evaluation of bacterial growth in expressed human milk.

*J Pediatr (Rio J). 2007;83(1):87-91: Breastmilk, bacteria, acidity.*

1. Doutor. Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ.
2. Mestre. Instituto Fernandes Figueira, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.

Artigo submetido em 18.08.06, aceito em 01.11.06.

**Como citar este artigo:** Novak FR, Cordeiro DM. The correlation between aerobic mesophilic microorganism counts and Dornic acidity in expressed human breastmilk. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(1):87-91.

Fonte financiadora: Fiocruz.

doi 10.2223/JPED.1589

## Introdução

O leite humano cru é um alimento rico em nutrientes<sup>1</sup> e fatores de proteção<sup>2</sup>. Sua qualidade pode ser avaliada sob os aspectos nutricional, imunológico, microbiológico e físico-químico, destacando-se a estabilidade físico-química na manutenção de suas características<sup>3</sup>. Dentre os fatores que afetam tal estabilidade, o papel da acidez tem sido amplamente destacado<sup>3-5</sup>.

Entre as causas de elevação da quantidade de microrganismos no leite humano ordenhado (LHO), estão relatadas as técnicas inadequadas de coleta, a higiene precária da doadora e dos utensílios e a manutenção do leite fora da cadeia de frio. O crescimento bacteriano produz fermentação e acidificação do leite, podendo levar à redução dos componentes nutricionais e imunológicos e desqualificar sua utilização<sup>4</sup>. O LHO acidificado pode não suprir as necessidades nutricionais específicas dos recém-nascidos prematuros, de baixo peso, ou imunologicamente vulneráveis. A acidificação desestabiliza proteínas solúveis e micelas de caseína, favorece a coagulação, aumenta a osmolaridade, altera o *flavor* (sabor e odor) e reduz o valor imunológico. Os carboidratos – fonte de energia das bactérias – são transformados em ácido lático, que se ioniza em meio aquoso, liberando prótons (H<sup>+</sup>), desestabilizando a caseína e indisponibilizando o cálcio e o fósforo<sup>4</sup>. Portanto, quanto maior a produção de ácido lático, menor a biodisponibilidade do cálcio e do fósforo no leite<sup>5</sup>.

A acidez do leite humano pode ser original – determinada pelos constituintes do leite – ou desenvolvida, resultante da produção de ácido lático pela degradação da lactose. Essa distinção não tem importância prática, já que se busca conhecer a acidez total do produto<sup>5</sup>. O leite humano, imediatamente após a ordenha, está praticamente livre de ácido lático, e sua acidez total pode ser considerada original. O ambiente favorável ao crescimento da microbiota é o que permite a produção do ácido lático e a progressiva elevação dos valores de acidez Dornic (AD)<sup>5</sup>.

A determinação da AD é obrigatória no controle de qualidade dos bancos de leite humano no Brasil. A análise visa garantir a manutenção das propriedades físico-químicas do leite cru e representa importante elemento para a seleção antes da pasteurização<sup>4,5</sup>.

Considerando a relevância do tema, o objetivo do presente trabalho foi determinar a relação entre a população total de microrganismos aeróbios mesófilos – que representa a maioria dos constituintes dessa microbiota<sup>6</sup> – e os valores de AD no LHO.

## Métodos

As amostras foram obtidas a partir de coleta domiciliar do leite de doadoras regularmente cadastradas no Banco de Leite Humano (BLH) do Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz. Os critérios de inclusão foram: leite hu-

mano ordenhado, maduro, cru, que não fosse exclusivo (doado da mãe para o próprio filho), recebido no BLH-IFF congelado, em frascos de vidro boro-silicato com tampa de plástico e fechamento perfeito, contendo volume  $\geq 350$  mL. A amostragem do estudo foi determinada por todo o leite recebido para pasteurização no BLH do IFF e que preenchesse os critérios de inclusão, no período de 10/05/2006 a 31/07/2006. Um total de 200 amostras foi coletado, consecutivamente, a partir do leite degelado e reenvasado em frasco estéril, durante os procedimentos de seleção para pasteurização.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

O parâmetro utilizado para o controle da acidez em LHO é a medida da AD, expressa em graus Dornic (°D). A Rede Nacional de Bancos de Leite Humano (RNBLH) recomenda que o LHO com AD acima de 8 °D seja considerado impróprio para o consumo e descartado antes do processamento<sup>5</sup>.

A determinação do grau de AD foi realizada pelo mesmo profissional em todas as amostras, como descrito por Silva & Almeida<sup>7</sup>, ou seja, titulando-se o leite com soda N/9 (solução Dornic) na presença do indicador fenolftaleína. Cada 0,01 mL de solução Dornic gasto para neutralizar 1 mL de LHO corresponde a 1°D.

Após a titulação da AD, foi realizada a contagem em placa para determinação dos microrganismos aeróbios mesófilos viáveis, conforme descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*<sup>8</sup>. Cada amostra foi semeada, em duplicata, em placa contendo meio de cultura (Agar Plate Count, marca Oxoid) e incubada em estufa a 32 °C. Completadas 48 h, procedeu-se a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para verificar a correlação entre o valor da AD e a população de mesófilos, expressa em logaritmo de base 10, utilizando o pacote estatístico SPSS versão 12 para Windows. O nível de significância foi estabelecido em  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 1. Das 200 amostras analisadas, 192 (96%) estavam dentro dos valores aprovados para consumo ( $AD \leq 8$  °D). Nessas amostras, o número máximo de UFC/mL foi de  $6,7 \times 10^5$ . O número de UFC/mL mostrou associação positiva com os valores de AD. Cada intervalo crescente de AD correspondeu a um valor maior e diferente de população bacteriana. A correlação entre as variáveis foi  $R = 0,948$  para o total das 200 amostras e  $R = 0,959$  para as 192 amostras com acidez menor ou igual a 8 °D, aprovadas para consumo. A correlação entre as variáveis foi significativa ( $p < 0,001$ ) nas duas situações (Figura 1).

### Discussão

Apesar de o LHO conter diversas substâncias protetoras<sup>2</sup>, tal fato não garante segurança contra contaminação e crescimento bacteriano, podendo constituir-se em veículo de microrganismos patogênicos<sup>9</sup>. Estão bem estabelecidas as condições para obtenção de leite com boa qualidade: o controle higiênico-sanitário da coleta e da manipulação do produto e a conservação sob baixas temperaturas durante todas as fases do processamento, até a pasteurização e estocagem<sup>10</sup>.

Silva & Almeida<sup>11</sup> encontraram contagem microbiana elevada no LHO, possivelmente decorrente de contaminantes

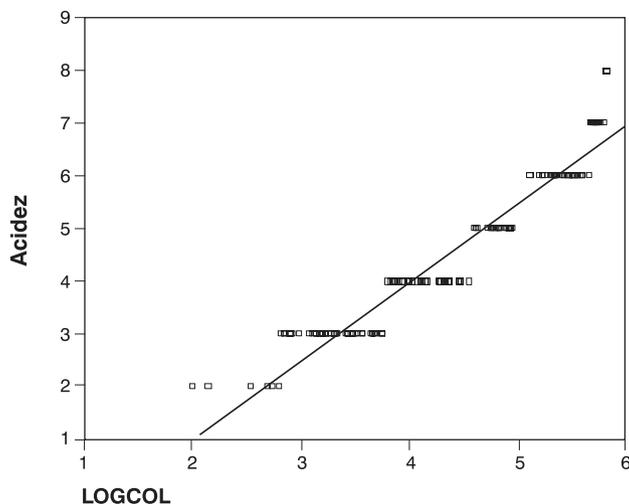
externos. A contagem em placa de mesófilos demonstrou que, em 170 amostras, a população bacteriana variou de  $10^1$  a  $10^7$  UFC/mL, sendo que as contagens mais encontradas estavam entre  $10^2$  e  $10^3$  UFC/mL. Nossos dados, de maneira semelhante, variaram de  $10^2$  a  $10^7$  UFC/mL. Os valores de  $10^4$  e  $10^5$  foram os mais observados.

A distribuição da AD analisada por Silva & Almeida<sup>12</sup> em 172 amostras de LHO difere dos dados do presente estudo, embora ambos tenham revelado percentual semelhante de leites com acidez  $\leq 8$  °D: 94,6 e 96%, respectivamente.

A literatura relata o desenvolvimento de acidez no leite humano como resultado da produção de ácido láctico a partir

**Tabela 1** - Distribuição das freqüências das amostras analisadas (n = 200)

Acidez Dornic	Intervalo UFC/mL	nº de amostras	Percentual de amostras	Cumulativo de amostras (%)
2	$1,0 \times 10^2 - 6,3 \times 10^2$	6	3	3
3	$6,6 \times 10^2 - 5,7 \times 10^3$	47	23,5	26,5
4	$6,4 \times 10^3 - 3,6 \times 10^4$	40	20	46,5
5	$4,0 \times 10^4 - 9,0 \times 10^4$	37	18,5	65,5
6	$1,3 \times 10^5 - 4,6 \times 10^5$	37	18,5	83,5
7	$4,9 \times 10^5 - 6,2 \times 10^5$	20	10	93,5
8	$6,6 \times 10^5 - 6,7 \times 10^5$	5	2,5	96
9	$8,0 \times 10^5 - 9,3 \times 10^5$	2	1,0	97
10	$5,5 \times 10^6 - 7,6 \times 10^6$	2	1,0	98
11	$1,2 \times 10^7 - 1,3 \times 10^7$	3	1,5	99,5
12	$1,5 \times 10^7$	1	0,5	100



Correlação de Pearson ( $p < 0,001$ ).  
LOGCOL = logaritmos para unidades formadoras de colônia (UFC/mL); UFC = unidades formadoras de colônia.

**Figura 1** - Correlação entre UFC/mL e acidez Dornic nas amostras aprovadas - acidez Dornic  $\leq 8$  °D

da degradação da lactose por microrganismos<sup>10,12-14</sup>. No entanto, apenas dois estudos avaliaram essa relação<sup>13,14</sup>.

Silva & Almeida<sup>13</sup> analisaram a relação entre AD e o crescimento bacteriano no LHO cru a 37 °C. Os resultados revelaram que, após 4 h, o crescimento de mesófilos no leite maduro permitiu a elevação progressiva da AD. Na amostra de colostro, o aumento significativo da acidez ocorreu apenas após 16 h de incubação, quando o crescimento bacteriano elevou-se 28 vezes do valor inicial. Segundo os autores, a diferença decorreu, possivelmente, da maior quantidade de fatores protetores no colostro. O estudo concluiu que, além do rigor higiênico-sanitário, o grau de contaminação do produto sofre influência direta de seus fatores de proteção. Tal diferença não pôde ser analisada no presente trabalho, pois apesar de utilizar leite cru, testamos apenas amostras de LHO maduro.

Bortolozzo et al.<sup>14</sup> demonstraram o crescimento bacteriano e a elevação da AD em amostras de leite pasteurizado e congelado. O estudo chama a atenção para a possibilidade da contaminação e alteração da estabilidade físico-química do leite pasteurizado em função da manipulação, após sua distribuição para o consumo.

Embora os trabalhos descritos apresentem dados sobre a correlação entre população bacteriana e AD no leite humano, as diferenças metodológicas impediram a comparação com os resultados do presente artigo.

Luzeau et al.<sup>15</sup> demonstraram que o leite humano fresco ou pasteurizado e congelado pode sofrer lipólise com aumento da AD. Em leites ácidos com taxas normais de ácido

lático, a alteração decorreria da elevação da taxa de ácidos graxos livres produzidos pela lipase. Nossos dados não permitiram a detecção de outras influências sobre a elevação dos valores da AD, tais como aquela da oxidação lipídica que possa ter ocorrido nas amostras analisadas.

Como a população de microrganismos aeróbios mesófilos inclui a maioria dos contaminantes presentes no leite humano ordenhado, dentre eles os patogênicos, e permite uma visão geral sobre a carga microbiana existente<sup>8</sup>, sua estreita correlação ( $p \leq 0,001$ ) com os valores de AD indica que a determinação da AD é um método eficaz para avaliar indiretamente o crescimento bacteriano no LHO.

Novos estudos serão importantes para definir o papel dos diversos microrganismos que compõem o grupo dos mesófilos na elevação da AD do LHO. Impõe-se, ainda, a realização de pesquisas que busquem detectar o nível de acidez incorporada ao LHO pela oxidação lipídica.

## Referências

1. [Breastfeeding and the use of human milk](#). American Academy of Pediatrics. Work Group on Breastfeeding. *Pediatrics*. 1997;100:1035-9.
2. Hamosh M. [Bioactive factors in human milk](#). *Pediatr Clin North Am*. 2001;48:69-86.
3. Cavalcante JLP. Aspectos físico-químicos do leite humano cru e congelado dissertação. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará; 2001.
4. Galhardo ALSM, Araújo WMC, Borgo LA. [Acidez Dornic como parâmetro de qualidade em bancos de leite humano](#). *Hig Aliment*. 2002;16:16-27.

5. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano (RNBLH). Determinação de acidez titulável - método Dornic. BLH-IFFNT-29.05, 2005. Rio de Janeiro. [www.redeblh.fiocruz.br/mediaseleclas.pdf](http://www.redeblh.fiocruz.br/mediaseleclas.pdf). Acesso: 19/10/2006.
6. Marvin LS. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington: APHA; 2001.
7. Silva VG, Almeida JAG. Padronização da técnica de acidez Dornic. I Congresso Paulista de Bancos de Leite; 2001 1-5 dez; Ribeirão Preto. [www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm](http://www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm). Acesso: 18/10/2006.
8. Speck LM. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 1984.
9. Almeida JAG. **Amamentação: um híbrido natureza-cultura**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1999.
10. Almeida JAG, Novak FR. O leite humano: qualidade e controle. In: Santos Jr., organizador. Fisiologia e patologia da lactação. Natal: Sociedade Brasileira de Mastologia; 1995. p. 31-42.
11. Silva VG, Almeida JAG. Crescimento bacteriano em leite humano ordenhado. I Congresso Paulista de Bancos de Leite; 2001 Dez 1-5; Ribeirão Preto. [www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm](http://www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm). Acesso: 18/10/2006.
12. Silva VG, Almeida JAG. Acidez Dornic em leite humano ordenhado. I Congresso Paulista de Bancos de Leite; 2001 Dez 1-5; Ribeirão Preto. [www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm](http://www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm). Acesso: 18/10/2006.
13. Silva VG, Almeida JAG. Curva de crescimento bacteriano em leite humano ordenhado x acidez Dornic. I Congresso Paulista de Bancos de Leite; 2001 Dez 1-5; Ribeirão Preto. [www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm](http://www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm). Acesso: 18/10/2006.
14. Bortolozzo EFQ, Pietroski G, Baggio R, Candido LMB. **Padrão microbiológico e sanitário do leite humano, processado em banco de leite**. Higiene Alimentar. 2004;12:85-8.
15. Luzeau R, Barrois V, Odievre M. **Acide gras non estérifies et acidité titrable du lait maternel**. Arch Fr Pediatr. 1983;40:449-51.

## Correspondência:

Franz R. Novak  
Instituto Fernandes Figueira  
Av. Rui Barbosa, 716, Flamengo  
CEP 22250-020 – Rio de Janeiro, RJ  
Tel.: (21) 2554.1858  
Fax: (21) 2553.9662  
E-mail: franz@fiocruz.br