

Contagem de bactérias mesófilas aeróbias e características físico-químicas do leite humano armazenado em embalagem de polietileno

Aerobic mesophilic bacteria count and physical and chemical characteristics of breast milk stored in polyethylene packages

RESUMO

Mayara de Simas Mesquita^{1,*}

Alexandra Anastácio Monteiro Silva^{II}

Ana Paula dos Santos Rocha Tavares^{II}

Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida^I

Objetivo: Avaliar a contaminação por bactérias mesófilas aeróbias em leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP) e a influência da embalagem de polietileno sobre as características físico-químicas do leite humano (LH) cru e pasteurizado. **Metodologia:** Foram analisadas 55 amostras de leite humano ordenhado (LHO), oriundas do Banco de Leite Humano (BLH) do Hospital Maternidade Herculano Pinheiro (HMHP) e do Instituto Fernandes Figueira (IFF). Na determinação das condições higiênico-sanitárias do LHOP, foi realizada contagem de bactérias mesófilas aeróbias. A acidez Dornic, o valor energético, gordura, lactose e proteínas em LH cru e pasteurizado foram realizados antes e após o armazenamento de 15 dias nas embalagens. Foram realizadas análises descritivas e da influência da embalagem sobre os parâmetros, segundo ANOVA. Valores $p < 0,05$ foram considerados significativos. **Resultados:** A ocorrência de mesófilos no LHOP variou de 0 a 12%. O LH cru e pasteurizado apresentaram acidez $< 8^{\circ}$ Dornic, indicando boas práticas de manejo e condições higiênico-sanitárias adequadas. Gordura, valor energético, lactose e proteínas do LH nas embalagens de polietileno e vidro variaram, respectivamente, 3,2-3,5%, 65-68 Kcal/dL, 6,0% e 0,9-1,3%. Não foram observadas diferenças significativas nas características físico-químicas do LH entre as embalagens. **Conclusão:** A embalagem de polietileno pode ser uma alternativa viável para uso em BLH.

PALAVRAS-CHAVE: Leite Humano; Banco de Leite Humano; Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano; Embalagem Plástica para Armazenamento de LH; Embalagem de Vidro

ABSTRACT

Objective: To determine the aerobic mesophilic bacteria count in pasteurized human milk and to evaluate the influence of polyethylene bags on the physicochemical characteristics of raw and pasteurized human milk. **Methods:** 55 samples of human milk coming from the Human Milk Bank of Herculano Pinheiro Hospital and Fernandes Figueira Institute were analyzed. An aerobic mesophilic bacteria count was performed when determining the sanitary hygienic quality of pasteurized human milk. Dornic acidity, energy, fat, lactose and proteins in raw and pasteurized human milk were taken before and after 15-day storage in the packages. The influence of the package was analyzed using ANOVA. Values of $p < 0.05$ were considered significant. **Results:** The occurrence of mesophiles in pasteurized human milk ranged from 0 to 12%. The raw and pasteurized human milk had $< 8^{\circ}$ D acidity, indicating good handling practices and appropriate sanitary hygienic conditions. The fat, energy, protein and lactose of human milk in the polyethylene bag and glass were averaged: 3.2-3.5%, 65-68 kcal/dL, 6.0% and 0.9-1.3%, respectively. No significant differences were observed in the physicochemical characteristics of human milk among the packages. **Conclusion:** Polyethylene packaging for human milk storage can be a viable alternative to milk banks.

^I Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS / Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil

* E-mail: mayarasimas@yahoo.com.br



INTRODUÇÃO

O aleitamento materno é recomendado exclusivamente para os recém-nascidos até os seis meses de vida e de forma complementar até os dois anos de idade, pois contempla todos os requisitos nutricionais essenciais ao seu crescimento e desenvolvimento saudáveis¹, atuando como um excelente agente imunizador². Entretanto, recém-nascidos com idade gestacional abaixo de 34 semanas (pré-termo) são incapazes de sugar, deglutir e respirar coordenadamente³ e por isto dependem da oferta de leite humano (LH) do Banco de Leite Humano (BLH).

A literatura é quase unânime em recomendar leite materno para os recém-nascidos prematuros, incluindo os de muito baixo peso, e isso se deve ao crescente número de evidências epidemiológicas que mostram a importância do LH para esses recém-nascidos, não só para a sua sobrevivência, mas para a sua qualidade de vida, proteção contra enterocolite necrotizante e infecções em geral⁴.

De acordo com a RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006⁵, o BLH deve: registrar, recepcionar e realizar uma triagem das mães doadoras. Ao receber o leite ordenhado, ele deve seguir o fluxo-grama ilustrado na Figura 1.

A oferta de LH para recém-nascidos pré-termo, internados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI), constitui parte do tratamento e envolve a participação do BLH cujo modelo de controle de qualidade preventivo e dinâmico assegura um produto com condições higiênico-sanitárias adequadas⁷.

A qualidade do Leite Humano Ordenhado (LHO) pode ser definida como uma grandeza que resulta da avaliação conjunta de parâmetros que incluem as características nutricionais, imunológicas, químicas e microbiológicas⁸.

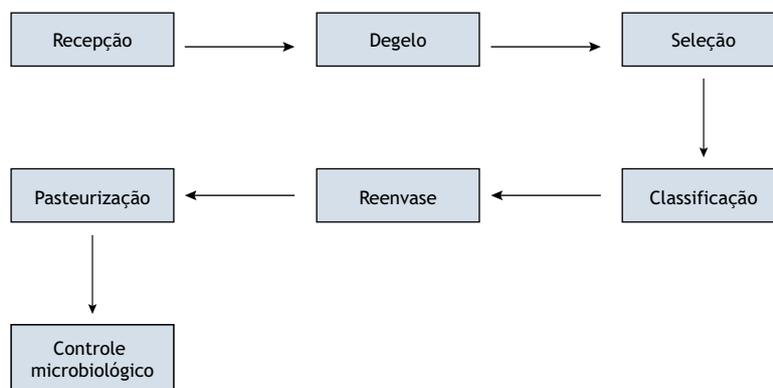
Do ponto de vista de qualidade, fatores como a embalagem, a temperatura de transporte e armazenamento, o processamento térmico, entre outros podem influenciar o conteúdo nutricional^{9,10,11} e as características microbiológicas do LH^{12,13}.

A embalagem de acondicionamento do LH, de acordo com a RDC nº 171⁵, deve ser constituída de material inerte e inócuo ao LHO, em temperaturas na faixa de -25°C a 128°C, e preservar o valor biológico do LHO. Além disso, as embalagens devem ser esterilizadas e necessitam proporcionar vedamento perfeito para que a integridade do produto seja mantida. Atualmente, os frascos de vidro são os utilizados no BLH, entretanto, a migração de produtos que antes eram acondicionados em vidro para as embalagens plásticas¹⁴ limita a doação de frascos de vidro.

No mercado brasileiro, existe uma embalagem plástica para o armazenamento do LH que é composta de polietileno de baixa densidade (PEBD) e polietileno linear de baixa densidade (PELBD), de acordo com a legislação para embalagens e equipamentos plásticos¹⁵, livre de plastificantes e Bisfenol A (BPA), estéril e transparente.

Apenas dois estudos avaliaram a influência da embalagem sobre os constituintes do LH. O estudo de Lawrence¹⁰ avaliou a influência da embalagem de polietileno sobre os constituintes imunológicos celulares, tais como leucócitos, macrófagos, células T, neutrófilos, seus produtos, incluindo a lactoferrina, lisozima, fibronectina, IgA secretória, mucinas, oligossacarídeos e nutrientes como lipídios, vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis. Este estudo observou que a maioria dos constituintes imunológicos e nutrientes presentes no LH não são afetados pelo armazenamento, de até 24 horas, na embalagem de polietileno, entretanto, o estudo apontou uma pequena redução da função celular e da concentração de lisozima. No estudo de Chang et al.¹¹, foi analisada a influência do armazenamento do LH, durante 48 horas, em nove tipos de embalagens (plástico e vidro). A concentração total de carboidratos e proteínas não foi afetada, entretanto, observou-se uma redução de até 9% no teor de lipídios em várias embalagens.

Não existem estudos avaliando a influência do armazenamento do LHO cru e pasteurizado (LHOC e LHOP) em embalagem de polietileno durante período superior a 48 horas. Assim, considerando a importância do LH coletado em BLH para a saúde dos recém-nascidos internados em UTI neonatais, o presente estudo teve como objetivo determinar a contagem de bactérias mesófilas aeróbias em LHOP e



Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008⁶.

Figura 1. Fluxograma de processamento do Leite Humano Ordenhado.



avaliar a influência da embalagem de polietileno nas características físico-químicas do LHO e LHOP.

METODOLOGIA

Foram coletadas 55 amostras de leite humano, provenientes do Banco de Leite Humano do Hospital Maternidade Herculano Pinheiro (HMHP) e do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF), situados na cidade do Rio de Janeiro, no período de agosto de 2013 a dezembro de 2014.

As análises de acidez, crematócrito, lactose e proteína foram realizadas em amostras de leite humano cru e, no pasteurizado, após 15 dias de congelamento em embalagem plástica e embalagem de vidro.

O parâmetro utilizado para o controle da acidez em LHO é a medida da acidez Dornic, expressa em graus Dornic (°D). A determinação do grau de acidez Dornic foi realizada 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 1,0 mL de LHO corresponde a 1°D¹⁶. A Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (RBLH) recomenda que o LHO com acidez Dornic acima de 8°D seja considerado impróprio para o consumo e descartado antes do processamento⁶.

A análise de crematócrito foi realizada segundo a metodologia indicada pela RBLH que consiste na centrifugação do LH por 15 minutos para a separação do creme e do soro do leite. Com auxílio de uma régua milimetrada, mediu-se o comprimento da coluna de creme (mm) e da coluna total do produto (coluna de creme + coluna de soro, expressos em mm). De posse destes valores obtém-se o teor de creme, de gordura e valor energético, segundo Lucas et al.¹⁷. A análise de lactose foi realizada pelo método de Fehling¹⁸ que se baseia na redução dos íons cúpricos a íons cuprosos, pela lactose (açúcar redutor), em meio alcalino. A determinação da proteína total foi feita pelo método de Bradford, utilizando-se o kit comercial *Genese*¹⁹. Este método se baseia na utilização do corante *Comassie Brilliant Blue* que reage com as proteínas do LH e adquire coloração azul. Em seguida, as respectivas absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro (comprimento de onda de 595 nm), e a concentração foi obtida mediante a comparação com uma curva padrão.

A concentração de macronutrientes no LH é amplamente difundida em diferentes estudos e sofre variações intraindividuais e interindividuais. De maneira geral, os teores variam de 3,2-4,9% para gordura, 6,0-7,2% para lactose e 0,8-1% para proteína, nos estudos observados^{1,3,7,11}.

A determinação das bactérias mesófilas aeróbias viáveis no LHOP foi realizada empregando-se a técnica *Pour Plate* em placas de Petri, usando *Plate Count Agar* e incubação a 37°C por 48 horas²⁰.

A legislação brasileira não estabelece limites para a contagem global de bactérias mesófilas em LH, entretanto, já se

sabe que contagens entre 10² e 10⁵ UFC (Unidades Formadoras de Colônias)/mL estão associadas a valores de acidez entre 2 e 7°D^{13,21}. A partir destes resultados, convençionamos em nossa pesquisa, adotar como ponto de corte o limite de 10² UFC/mL para a contagem de bactérias mesófilas em LH pasteurizado.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Fluminense (UFF) sob o número 35028114600005243.

A influência do tipo de embalagem sobre os parâmetros do leite foi determinada por análise de variância (Anova) utilizando o pacote estatístico SPSS versão 12 para Windows. O nível de significância foi considerado $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ocorrência de bactérias mesófilas aeróbias em LHOP é apresentada na Tabela 1. Os resultados do presente estudo demonstram que a obtenção e manipulação do LH se deram sob boas condições higiênico-sanitárias no processamento do LH, visto que não foi observada contagem de bactérias mesófilas aeróbias acima de 10² UFC/mL²² nos leites com e sem diluição.

Podemos dizer que a qualidade do LHO resulta da avaliação de um conjunto de parâmetros, sendo um deles, as características microbiológicas. Como a população de bactérias mesófilas aeróbias inclui a maioria dos contaminantes presentes no LHO, dentre eles os patogênicos, e permite uma visão geral sobre a carga microbiana existente¹¹, a contagem de bactérias mesófilas aeróbias é um parâmetro fundamental das condições higiênico-sanitárias do LH que será oferecido ao lactente²³.

Em estudo conduzido em um hospital público do Distrito Federal, Pontes et al.²⁴ demonstraram que, em 13 das 27 amostras de LHOP analisadas, 48% apresentaram contagem de mesófilos aeróbios superior a 10 UFC/ml. Este resultado pode indicar um insatisfatório processamento do LH²⁵. No estudo de Souza e Silva²⁶, foram analisadas 20 amostras quanto à contagem de mesófilos aeróbios, sendo observados valores médios de 73 UFC/mL. Em nosso estudo, menos de 15% das amostras apresentaram contagem de mesófilos aeróbios superior a 10 UFC/mL.

Tabela 1. Ocorrência de bactérias mesófilas aeróbias nas amostras de leite humano ordenhado pasteurizado.

Amostra	Ocorrência Percentual de Mesófilos (%)	
	UFC/mL	%
LHOP sem diluição	< 10 ¹	12
	10 ¹ -10 ²	0
	> 10 ²	0
LHOP diluído 10 ⁻¹	< 10 ¹	7
	10 ¹ -10 ²	0
	> 10 ²	0
LHOP diluído 10 ⁻²	< 10 ¹	3
	10 ¹ -10 ²	0
	> 10 ²	0



A composição nutricional média obtida para o LH armazenado nas embalagens plásticas de polietileno e de vidro é apresentada na Tabela 2.

No presente estudo, a acidez do LHO e LHOP, em ambas as embalagens, apresentou-se abaixo de 8°D, como preconiza a RDC nº 171, 2006⁵, portanto, houve controle rigoroso das etapas de ordenha e processamento do LH. Os resultados do presente estudo foram semelhantes ao trabalho de Sousa e Silva²⁶, que encontraram teores de acidez de 2,8°D a 3,6°D nas amostras de LHO antes do congelamento e LHOP, respectivamente. Entretanto, este mesmo estudo apresentou teores de acidez de 7,8°D para LHO após congelamento.

A elevação da acidez é resultado da proliferação de micro-organismos que promovem o desdobramento da lactose em ácido láctico²⁷. Entre as causas de elevação da quantidade de micro-organismos no 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 utilização²¹, colocando também em risco a saúde e até mesmo a vida de pacientes tão vulneráveis. O LHO acidificado pode não suprir as necessidades nutricionais específicas dos recém-nascidos prematuros, principalmente de baixo peso. A acidificação desestabiliza proteínas solúveis e micelas de caseína, favorece a coagulação, aumenta a osmolaridade e altera o *flavor* (sabor e odor). Os carboidratos - fonte de energia das bactérias - são transformados em ácido láctico, que se ioniza em meio aquoso, liberando prótons (H⁺), desestabilizando a caseína e indisponibilizando o cálcio e o fósforo²¹. Portanto, quanto maior a produção de ácido láctico, menor a biodisponibilidade do cálcio e do fósforo no leite²⁸.

Silva e Almeida¹⁶ analisaram a relação entre a acidez Dornic e o crescimento bacteriano no LHO a 37°C. Os resultados revelaram que, após 4 horas, o crescimento de mesófilos no leite maduro permitiu a elevação progressiva da acidez Dornic. Uma associação positiva entre a acidez Dornic e a contagem de mesófilos aeróbios foi observada no estudo de Novak e Cordeiro²¹. Em nosso estudo, a baixa contagem de bactérias mesófilas aeróbias refletiu-se em baixos valores de acidez Dornic.

Na Tabela 2, os LHO e LHOP, em ambas as embalagens, apresentaram teor de gordura e o valor energético variando, em média,

de 3,2 a 3,5% e 65 a 68 Kcal/dL. Nossos resultados são consistentes com o valor energético médio de 70 Kcal/dL observado em amostras de LH²⁹.

Sousa e Silva²⁶ analisaram 20 amostras de LH do BLH do município de João Pessoa, PB, e obtiveram médias dos teores de gordura de 4,1%, 2,5% e 2% e valor energético de 73, 56 e 56 Kcal/dL no LHO antes do congelamento, LHO após o congelamento e LHOP, respectivamente.

Diferenças nos resultados podem ser explicadas pelos processos de congelamento e descongelamento que propiciam rompimento das membranas dos glóbulos de gordura, facilitando sua coalescência e aderência às paredes dos frascos armazenadores, resultando em valores lipídicos reduzidos devido à lipólise do LH²⁹.

Os teores de lactose se apresentaram em média 6,0% no LHO e LHOP, em ambas as embalagens (Tabela 2). Nossos resultados são comparáveis ao estudo de Abranches et al.³ no qual o conteúdo de lactose foi, em média, 6,5%. Braga e Palhares³⁰ também não encontraram diferenças entre a lactose nas amostras de LHO e LHOP, quando analisaram 12 amostras provenientes de *pool* de leite maduro. Esses resultados são consistentes com a estabilidade da lactose mediante o processo de congelamento, pasteurização e descongelamento, já observado em diferentes estudos^{12,13}.

Os valores de proteína no LHO e LHOP, em ambas as embalagens, variaram, em média, de 0,9% a 1,3%. Nossos resultados são comparáveis ao estudo de Abranches et al.³; Chang et al.¹¹; Silva et al.²⁹ e Braga e Palhares³¹, que reportaram valores médios de proteínas variando de 0,9 a 1,1%. Semelhante ao estudo de Chang et al.¹¹, não foram observadas diferenças significativas na concentração de proteínas entre as embalagens de plástico e vidro. O aumento aparente, mas não significativo, da concentração de proteínas do LH na embalagem plástica comparada à embalagem de vidro, pode estar associado à maior perda de água (volatilização) associada aos processos de congelamento e descongelamento.

CONCLUSÃO

O índice de acidez se apresentou dentro dos valores preconizados pela legislação, resultando possivelmente em um leite humano com menor precipitação de caseína, maior biodisponibilidade de cálcio e fósforo e melhor valor imunológico. Esses resultados são consistentes com a qualidade microbiológica observada em nossas amostras, visto

Tabela 2. Teores de acidez, gordura, energia, lactose e proteína do LH nas embalagens de vidro e plástico.

Análises	LHO Fresco	LHO Vidro	LHO Plástico	LHOP Vidro	LHOP Plástico
Acidez (°D)	2,9 ± 0,9	3,1 ± 1,4	3,1 ± 1,2	3,0 ± 0,8	3,2 ± 1,1
Gordura (%)	3,4 ± 1,1	3,2 ± 1,5	3,3 ± 1,2	3,4 ± 1,4	3,5 ± 1,6
Energia (kcal/100 mL)	65,0 ± 1,7	64 ± 1,5	65 ± 1,2	65 ± 1,4	68 ± 1,6
Lactose (%)	*	6,0 ± 0,9	6,0 ± 1,4	6,0 ± 1,3	6,0 ± 1,3
Proteínas (%)	*	1,0 ± 0,7	1,3 ± 0,7	0,9 ± 0,6	1,2 ± 0,6

LH: Leite Humano; LHO: Leite Humano Ordenhado Cru; LHOP: Leite Humano Ordenhado Pasteurizado.

Os resultados estão expressos como Média ± Desvio Padrão.

*As análises de lactose e proteína não foram realizadas no LHO fresco.



que em uma condição de contaminação microbiológica a elevação da acidez promove o desdobramento da lactose em ácido láctico e pode causar a degradação dos nutrientes presentes no LH.

O valor energético, gordura, proteína e lactose se mostraram dentro dos valores esperados e semelhantes entre as amostras armazenadas nas embalagens de polietileno e de vidro.

Concluimos que a embalagem de polietileno se mostrou como alternativa viável para armazenamento do LH, visto que não influenciou o valor energético, gordura, proteínas e lactose das amostras estudadas. A continuidade deste estudo é necessária para se verificar a influência da embalagem de polietileno sobre outros nutrientes e componentes bioativos do LH, tais como células, enzimas, imunoglobulinas e hormônios.

REFERÊNCIAS

1. Anastácio AS, Silveira CLP, Mlekeley N, Donangelo CM. Distribution of lead in human milk fractions. *Biol Trace Elem Res.* 2004;102(1-3):27-37. doi:10.1385/BTER:102:1-3:027
2. Veloso FL, Almeida JA. O aleitamento materno nos programas brasileiros de pós-graduação em Pediatria: perfil das dissertações e teses elaboradas de 1971 a 2006. *Rev Paul Pediatr.* 2009;27(2):154-9. doi:10.1590/S0103-05822009000200006
3. Abranches AD, Soares FVM, G Junior SC, Moreira MEL. Efeito do congelamento e descongelamento nos níveis de gordura, proteína e lactose do leite humano natural administrados por gavagem e infusão contínua. *J Pediatr (Rio J).* 2014;90(4):384-8. doi:10.1016/j.jped.2013.11.001
4. Guigliani ERJ. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano do Brasil: tecnologia para exportar. *J Pediatr (Rio J).* 2002;78(3):183-4. doi:10.1590/S0021-75572002000300001
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução nº 171, de 04 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. *Diário Oficial União.* 5 set 2006;Seção 1.
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília, DF: Anvisa; 2008. (Tecnologia em serviços de saúde).
7. Silva FF. Qualidade do leite materno em banco de leite humano: aspectos bacteriológicos, físico-químicos e perfil de aminos bioativas [dissertação]. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
8. Rona MS, Novak FR, Portilho M, Pelissari FM, Martins ABT, Matioli G. Efeito do tempo e da temperatura de estocagem nas determinações de acidez, cálcio, proteínas e lipídeos de leite de doadoras de bancos de leite humano. *Rev Bras Saúde Matern Infant.* 2008;8(3):257-63. doi:10.1590/S1519-38292008000300004
9. Hamosh M, Ellis LA, Pollock DR, Henderson TR, Hamosh P. Breastfeeding and the working mother: effect of time and temperature of short-term storage on proteolysis, lipolysis, and bacterial growth in milk. *Pediatrics.* 1996;97(4):492-8.
10. Lawrence RA. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta Paediatr Suppl.* 1999;88(Suppl 430):14-8. doi:10.1111/j.1651-2227.1999.tb01295.x
11. Chang Y, Chen C, Lin M. The macronutrients in human milk change after storage in various containers. *Pediatr Neonatol.* 2012;53(3):205-9. doi:10.1016/j.pedneo.2012.04.009
12. Cunha MA. Métodos de detecção de micro-organismos indicadores. *Saúde Ambiente.* 2006;1(1):9-13.
13. Novak FR, Junqueira AR, Dias MSPC, Almeida JAG. Análise sensorial do leite humano ordenhado e sua carga microbiana. *J Pediatr (Rio J).* 2008;84(2):181-4. doi:10.1590/S0021-75572008000200016
14. Oliveira CB. Utilização na indústria farmacêutica de vidro e PET em frascos de xarope [monografia]. São Caetano do Sul: Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia; 2012.
15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999. Aprovar os Regulamentos técnicos: disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. *Diário Oficial União.* 20 maio 1999;Seção 1.
16. Silva VG, Almeida JAG. Padronização da técnica de acidez Dornic. In: 1º. Congresso Paulista de Bancos de Leite; 1-5 dez 2001 [acesso 21 set 2013]; Ribeirão Preto. Disponível em: <http://www.bvsam.icict.fiocruz.br/evcientif/1cpblh/1cpblh.htm>
17. Lucas A, Gibbs JAH, Lyster RLJ, Baum JD. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *Br Med J.* 1978;1(6119):1018-20.
18. Zenebon O, Sadocco N, Tiglea P, coordenadores. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2008.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
20. Speck LM. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2nd ed. Washington, DC: American Public Health Association; 1984.
21. Novak FR, Cordeiro DMB. Correlação de população de microorganismos mesófilos aeróbios e acidez Dornic no leite humano ordenhado. *J Pediatr (Rio J).* 2007;83(1):87-91. doi:10.1590/S0021-75572007000100015
22. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial União.* 3 jan 2001.
23. Vieczorek AL. Avaliação dos bancos de leite humano do Estado do Paraná [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.



24. Pontes MRA, Iwasaki Y, Oliveira YS. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do leite humano pasteurizado distribuído pelo banco de leite de um hospital público do Distrito Federal. *Hig Aliment.* 2003;17(107):43-9.
25. Castro MRCC. Avaliação da qualidade microbiológica de leite humano cru recebido em banco de leite humano [dissertação]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2006.
26. Souza PPR, Silva JA. Monitoramento da qualidade do leite humano ordenhado e distribuído em banco de leite de referência. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2010;69(1):7-14.
27. Moraes PS, Oliveira MMB, Dalmas JC. Perfil calórico do leite pasteurizado no banco de leite humano de um hospital escola. *Rev Paul Pediatr.* 2013;31(1):46-50. doi:10.1590/S0103-05822013000100008
28. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano. Determinação de acidez titulável: método Dornic. Rio de Janeiro: Rede Nacional de Bancos de Leite Humano; 2005[acesso 21 set 2013]. (Norma técnica BLH-IFFNT-29.05). Disponível em: www.redeblh.fiocruz.br/media/seleclas.pdf
29. Silva RC, Escobedo JP, Gioielli LA, Quintal VS, Ibidi SM, Albuquerque EM. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. *Quim Nova.* 2007;30(7):1535-38. doi:10.1590/S0100-40422007000700007
30. Braga LPM, Palhares DB. Efeito da evaporação e pasteurização na composição bioquímica e imunológica do leite humano. *J Pediatr (Rio J).* 2007;83(1):59-63. doi:10.1590/S0021-75572007000100011

Agradecimentos

Aos profissionais dos Bancos de Leite Humano do Hospital Maternidade Herculano Pinheiro e do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira pelo apoio para a execução das etapas de coleta de amostras e análises.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.