

Normas **Técnicas**

BLH-IFF/NT 29.21

**Leite Humano Ordenhado -
Determinação da Acidez
Titulável: Método Dornic**



Origem

Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano – Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira / Fundação Oswaldo Cruz / Ministério da Saúde

Autores

João Aprígio Guerra de Almeida
Franz Reis Novak
Vander Guimarães

Revisores

Andreia Fernandes Spinola
Danielle Aparecida da Silva
Jonas Borges da Silva
Maíra Domingues Bernardes Silva
Mariana Simões Barros
Miriam Oliveira dos Santos
Mônica Barros de Pontes

Designer Gráfico

Chester Robison Pereira Martins

1ª publicação: BLH-IFF/NT 29.05:
Leite Humano Ordenhado - Determinação
da Acidez Titulável: Método Dornic.
1ª revisão: BLH-IFF/NT 29.11
2ª revisão: BLH-IFF/NT 29.21

Palavras-chaves

Banco de Leite Humano. Leite Humano Ordenhado Cru. Acidez Dornic. Análises Físico-Químicas. Seleção. Classificação

Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano
Programa de Certificação Fiocruz para Bancos de Leite Humano
Sede: IFF/Fiocruz/ Centro de Referência Nacional para Bancos de Leite Humano.
Avenida Rui Barbosa 716, 1º andar, Flamengo, Rio de Janeiro - RJ, cep: 22250-020
Contatos:
(21) 2554-1703 - Banco de Leite Humano
(21) 2554-1889 - Secretaria Executiva rBLH
email: rblh@fiocruz.br / Portal: www.rblh.fiocruz.br



SUMÁRIO

- 1. Objetivo*
- 2. Documentos complementares*
- 3. Definições*
- 4. Fundamentos*
- 5. Condições gerais*
- 6. Condições específicas*
- 7. Quadro Teórico*
- 8. Anexos*



1. Objetivo

Esta Norma Técnica tem por objetivo estabelecer o procedimento e critérios para determinação da acidez titulável pelo método Dornic no leite humano ordenhado cru, visando a garantia da qualidade em Bancos de Leite Humano e sua certificação.

2. Documentos Complementares

Na elaboração desta Norma Técnica foram consultados:

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. BLH-IFF/NT 11.21: Higiene e Conduta: Funcionários. Rio de Janeiro, 2021.

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. BLH-IFF/NT 21.21: Recepção do Leite Humano Ordenhado Cru. Rio de Janeiro, 2021.

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. BLH-IFF/NT 23.21: Seleção e Classificação do Leite Humano Ordenhado Cru. Rio de Janeiro. 2021.

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. BLH-IFF/NT 24.21: Degelo do Leite Humano Ordenhado Cru. Rio de Janeiro. 2021.

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. BLH-IFF/NT 50.21: Ambiência: Manuseio de Resíduos e Material de Descarte em Bancos de Leite Humano e Postos de Coleta de Leite Humano. Rio de Janeiro, 2021.

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. BLH-IFF/NT 51.21: Biossegurança em Bancos de Leite Humano e Postos de Coleta de Leite Humano. Rio de Janeiro, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 171, de 04 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04 set. 2006.

3. Definições

Para os efeitos desta Norma Técnica, aplicam-se as seguintes definições:

- 3.1. **Acidímetro:** equipamento calibrado em frações de 0,01mL, utilizado para a titulação do leite humano ordenhado.
- 3.2. **Grau Dornic (°D):** é a unidade de valor do índice de acidez, quando a solução de hidróxido de sódio utilizada tem normalidade igual a N/9 fatorada.
- 3.3. **Índice de Acidez:** é o número de mililitros de hidróxido de sódio necessários para neutralizar o ácido láctico presente em 1mL de amostra.
- 3.4. **Microbiota Primária:** aquela decorrente da contaminação natural do interior das mamas.
- 3.5. **Microbiota Secundária:** aquela que se origina a partir de agentes externos, tais como utensílios, equipamentos e da manipulação inadequada.
- 3.6. **Solução Indicadora:** solução hidroalcoólica de fenolftaleína 1% p/v neutralizada, utilizada para indicar o ponto final da determinação da acidez.

4. Fundamentos

Em decorrência de sua própria composição, o leite humano apresenta uma acidez original. As micelas de caseína, os sais minerais (dentre os quais se destacam os fosfatos e citratos), bem como as proteínas do soro do leite, são os principais responsáveis por essa propriedade química.

Em termos didáticos, a acidez do leite humano pode ser classificada como original ou desenvolvida. A original resulta da presença de seus constituintes, e a desenvolvida decorre do ácido láctico, produzido a partir do crescimento bacteriano.


As bactérias, integrantes tanto da microbiota primária quanto da secundária, fermentam a lactose do leite humano, produzindo ácido láctico.

Cada molécula de lactose metabolizada produz 4 moléculas de ácido láctico, o que, além de aumentar a acidez do produto, concorre também para o aumento da osmolaridade e para a diminuição da biodisponibilidade do cálcio e fósforo presentes.

Essa redução resulta do ataque químico do ácido láctico às micelas de caseína, levando à precipitação e consequente insolubilização do cálcio, que, apesar de presente no leite e ser passível de detecção quantitativa através das técnicas laboratoriais usuais, tem a sua biodisponibilidade reduzida. 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.

Quanto maior a quantidade de ácido láctico produzido, menor a biodisponibilidade de cálcio e fósforo no leite humano ordenhado. De maneira prática, a distinção entre acidez original e desenvolvida não se faz importante no momento da mensuração, interessando apenas o conhecimento da acidez total, que reúne as duas.

Dependendo da técnica utilizada para determinação da acidez, esta pode ser denominada Atual ou Titulável.



A acidez Atual é determinada com auxílio de potenciômetros ou medidores de pH, bem como através de indicadores de potencial hidrogeniônico. Os valores são sempre expressos em pH.

Em condições normais, o leite humano tende a apresentar pH ligeiramente ácido, próximo ao da neutralidade, situando-se entre 6,5 e 6,9. Em virtude do sistema tampão, decorrente da composição do leite humano, para que ocorram mudanças nos valores do pH na ordem de 0,1 unidade são necessárias elevações consideráveis na acidez desenvolvida. Esse fato desqualifica o pH como indicador eficaz para detectar a acidez desenvolvida do leite humano, face à sua baixa sensibilidade.

A acidez Titulável é determinada sempre com o auxílio de uma solução padrão que contenha um titulante alcalino, mais especificamente uma base, que na maior parte das vezes é o hidróxido de sódio – NaOH.

A técnica se baseia em uma reação estequiométrica entre o titulante alcalino padrão e os constituintes com caráter ácido presentes no leite humano, até que ocorra uma completa neutralização.

O ponto final da reação é determinado com o auxílio de um pHmetro ou revelado através de soluções indicadoras, preparadas com substâncias que possuem grupamentos cromóforos em sua composição. Por essa razão, há mudança de cor de acordo com a mudança de pH.

Dependendo da solução básica utilizada como titulante no processo de determinação da acidez, esta recebe nomes diferentes. Quando a solução titulante é o hidróxido de sódio N/9 fatorada, também conhecido como Solução Dornic, cada 0,01mL gasto para neutralizar 1mL de leite humano ordenhado corresponde a 1 grau Dornic (1,0°D).


O leite humano recém-ordenhado, caso titulado imediatamente após a ordenha, apresenta-se praticamente livre de ácido láctico, e sua acidez total pode ser considerada original, com valores oscilando entre 1,0°D e 4,0°D.

À medida que sua microbiota encontra condições favoráveis para o crescimento, ocorre a produção de ácido láctico e a conseqüente elevação da acidez. Acidez maior que 8,0°D desqualifica o produto para o consumo. Mesmo apresentando valores inferiores a esse limite, a biodisponibilidade do cálcio e a osmolaridade variam de forma inversamente proporcional ao índice de acidez.

5. Condições Gerais

5.1. A determinação da acidez Dornic no leite humano ordenhado é uma análise que se enquadra no processo de seleção, pois qualquer valor situado na faixa de 1,0°D a 8,0°D, inclusive, são considerados conformes. Valores acima de 8°D são considerados não conformes sendo descartados conforme a Norma Técnica BLH-IFF/NT 50.21: Ambiência: Manuseio de Resíduos e Material de Descarte em Bancos de Leite Humano e Postos de Coleta de Leite Humano:

5.1.1. Dentre os valores de 1,0°D a 8,0°D, inclusive, obtidos na titulação das amostras, estes são considerados no processo de classificação, pois podem nortear os critérios de distribuição do leite humano ordenhado pasteurizado aos recém-nascidos de médio e alto risco internados, uma vez que indicam que a biodisponibilidade de cálcio e fósforo e a osmolaridade do produto variam de forma inversa à acidez, ou seja, quanto mais baixo o valor de acidez Dornic, maior a biodisponibilidade de cálcio e fósforo.



5.2. O profissional deve estar paramentado, desde o início do processo, conforme o estabelecido na Norma Técnica BLH-IFF/NT 11.21: Higiene e Conduta: Funcionários.

5.3. Prévio a realização das análises, o profissional deverá verificar a validade e integridade dos reagentes a serem utilizados, assim como as condições das vidrarias, verificando se não há resíduo de água e sabão que possam interferir com a análise.

6. Condições Específicas

6.1. A determinação da acidez Dornic deve ser realizada imediatamente após as análises sensoriais do leite humano ordenhado.

6.2. Os seguintes materiais e reagentes são utilizados na determinação da acidez Dornic:

6.2.1. Solução padrão de hidróxido de sódio N/9 fatorada, que deve ser mantida em frasco âmbar;

6.2.2. Solução indicadora de fenolftaleína hidroalcolica a 1% p/v em álcool de 95°GL neutralizada, que deve ser mantida em frasco âmbar e sob refrigeração.

6.3. Os seguintes equipamentos e utensílios deverão ser utilizados para a realização da análise:

6.3.1. Pipetador manual ou automático para análise quantitativa;

6.3.2. Pipetas volumétricas de 1mL;

6.3.3. Estante para suporte, revestida em PVC, para 24 ou 72 tubos;

6.3.4. Microbureta graduada ao centésimo ou Acidímetro com frasco âmbar e escala de 0,01mL;

6.3.5. Caixas isotérmicas revestidas em PVC ou caixas plásticas para o banho de água e gelo;

6.3.6. gelo reciclável;

6.3.7. Agitador tipo vórtex;


6.3.8. Frasco conta-gotas para a solução hidroalcolica de fenolftaleína a 1% p/v;

6.3.9. Tubos de ensaio (10 x 100mm).

6.4. Determinação da Acidez Dornic:

6.4.1. Coletar amostras para a determinação de acidez Dornic e posterior determinação do valor energético de todos os frascos contendo leite humano ordenhado cru que se apresentaram conformes de acordo com os padrões das análises sensoriais:

6.4.1.1. Os frascos contendo leite humano, enquanto as amostras são coletadas deverão permanecer em cadeia de frio.



6.4.2. O frasco de leite humano ordenhado cru prévio a coleta de amostras, deve ter seu volume uniformizado manualmente, e após a uniformização, pipetar 5mL de leite humano, em campo de chama ou em capela de fluxo laminar (ambiente controlado), com auxílio de Pipetador manual ou automático e transferir este volume para um tubo de ensaio de 10x100mm:

6.4.2.1. Proceder da mesma forma para cada frasco de leite degelado.

6.4.3. Os tubos de ensaio com as amostras de cada frasco de leite humano deverão ser mantidos em cadeia de frio (banho de água e gelo), até o início da análise;

6.4.4. A primeira alíquota de 1mL deverá ser utilizada apenas para rinsar a pipeta, sendo este volume descartado em frasco com água e detergente neutro;

6.4.5. Após rinsar a pipeta, pipetar quantitativamente 3 alíquotas de 1mL, da amostra coletada no item 6.4.2 para o interior de tubos de ensaio com capacidade para 5mL. Antes de pipetar cada alíquota, uniformizar cuidadosamente o tubo que contém a amostra de leite humano ordenhado a ser analisada em agitador de vortex. A amostragem do leite humano para determinação do valor de acidez Dornic deve ser realizado em triplicata;

6.4.6. O 1mL restante no tubo de ensaio será utilizado para a determinação do conteúdo energético do leite humano ordenhado;

6.4.7. Os tubos de ensaio com as alíquotas de 1mL para determinação da acidez Dornic deverão ser mantidos em cadeia de frio. Adicionar 1 gota de solução de fenolftaleína, sem deixar que escorra na parede do tubo de ensaio;


6.4.8. Após a adição da solução de fenolftaleína, proceder à titulação da alíquota de leite humano ordenhado com NaOH N/9 fatorada, gota a gota. Durante toda a titulação, o tubo de ensaio contendo o leite e a solução de fenolftaleína deve ser permanentemente agitado manualmente, com movimentos leves, para evitar a incorporação de ar ao produto. Evitar que a solução de NaOH N/9 fatorada escorra pela parede do frasco;

6.4.9. Interromper o procedimento de gotejamento da solução de NaOH N/9 fatorada quando houver a viragem do indicador, que passa a assumir coloração róseo-clara, ou seja, até aparecimento de coloração rósea persistente;

6.4.10. Proceder à leitura neste momento, verificando quantos mililitros de solução de hidróxido de sódio N/9 fatorada foram gastos durante a titulação (nunca a quantidade de gotas). Atenção, realizar as leituras de acidez Dornic em local com boa iluminação, e em uma mesa que permita que o seu campo visual fique na mesma altura que a bureta, isto facilitará a observação da posição real da base do menisco da solução:

6.4.10.1. Cada 0,01mL de hidróxido de sódio N/9 fatorada gasto corresponde a 1,0°D. Por exemplo: se em um ensaio forem gastos 0,04mL de solução, aquela amostra possui acidez titulável igual a 4,0°D;

6.4.10.2. O valor final da acidez Dornic corresponde à média aritmética dos três valores obtidos na testagem individual de cada amostra;



6.4.10.3. Quando o titulante (NaOH) não apresentar concentração exata N/9, levar em consideração o valor do fator de correção, multiplicar a média aritmética das três alíquotas pelo valor do fator de correção determinado durante a preparação da solução de NaOH N/9;

6.4.11. Considera-se conforme as amostras de leite humano ordenhado cru que apresentarem resultados qualquer valor situado na faixa de 1,0°D a 8,0°D, inclusive.

6.5. Cuidados na Determinação da Acidez Dornic:

6.5.1. Após o fim das análises, a solução NaOH N/9 fatorada restante no frasco, assim como aquela que está na bureta do acidímetro deverão ser descartadas. Após o descarte da solução, o profissional deverá rinsar a microbureta com água destilada ou deionizada, evitando assim a formação de cristais e entupimento da mesma;

6.5.2. Todos os resíduos a serem descartados, o frasco com água e sabão neutro, e a solução Dornic deverão seguir a Norma Técnica BLH-IFF/NT 50.21: Ambiência: Manuseio de Resíduos e Material de Descarte em Bancos de Leite Humano e Postos de Coleta de Leite Humano;

6.5.3. As amostras que apresentarem leitura maior que 8,0°D, são consideradas não conformes e todo volume de leite humano ordenhado que apresentar não conformidade deverá ser descartado de acordo com a Norma Técnica BLH-IFF/NT 50.21: Ambiência: Manuseio de Resíduos e Material de Descarte em Bancos de Leite Humano e Postos de Coleta de Leite Humano;

6.5.4. Os resultados obtidos nas análises de determinação da acidez Dornic do leite humano ordenhado devem ser registrados com instrumentos próprios para essa finalidade (vide Anexo desta Norma Técnica), para que se possa realizar a rastreabilidade de intercorrências e a consequente melhoria dos processos.



7. Quadro Teórico

PEREIRA, C.I.V; DAMETTO, J.F.S e OLIVEIRA, J.C.C Evaluation of human milk titrable acidity before and after addition of a nutritional supplement for preterm newborns. *J Pediatr (Rio J)*. 2016; 92 (5): 499-504.

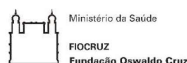
BORGES, M.S.; OLIVEIRA, A.M de M.; HATTORI, W.T e ABIDALLA. Quality of human milk expressed in a human milk bank and at home. *J Pediatr (Rio J)*. 2018; 94 (4): 339-403.

TOFFANIN, V.; DEMARCHI, M; LOPEZ-VILLALOBOS, N e CASSANDRO, M. Effectiveness of mid-infrared spectroscopy for prediction of the contents of calcium and phosphorus, and titratable acidity of milk and their relationship with milk quality and coagulation properties. *International Dairy Journal*, vol 41, feb, 2015, pages 68-73.

8. Anexos

Anexo I – Norma Técnica BLH – IFF/NT 29.21: Leite Humano Ordenhado - Determinação da Acidez Titulável: Método Dornic

Formulário para Seleção e Classificação do Leite Humano Ordenhado Cru



Programa de Certificação Fiocruz em Bancos de Leite Humano para o Sistema Único de Saúde (PCFioBLH-SUS)

BLH-IFF/PCFioBLH 0003

Formulário para Seleção e Classificação do Leite Humano Ordenhado Cru

Nº Frasco	Matrícula Doadora	Idade do LHO	Volume Estimado	Análise Sensorial				Análises Físico-Químicas														
				Embalagem	Sujidade	Cor	Flavor	Acidez Dornic				Crematócrito										
								AC1	AC2	AC3	Fator Dornic	°D	CT1	CT2	CT3	CC1	CC2	CC3	Kcal/L			

Onde

Análise sensorial deverá ser identificada como conforme (C) e não conforme (NC)

Análises Físico-químicas:

Acidez Dornic (AC) será preenchido com os mililitros gastos em cada titulação

Fator Dornic: é o valor a ser multiplicado pela média dos valores obtidos na solução Dornic

Crematócrito onde CT é a coluna total expressa em mm e CC é a coluna de creme expressa em milímetros.

Anexo II – Norma Técnica BLH – IFF/NT 29.21: Leite Humano Ordenhado - Determinação da Acidez Titulável: Método Dornic

Formulário para Registro da Frequência Diária de Não Conformidades



Programa de Certificação Fiocruz em Bancos de Leite Humano para o Sistema Único de Saúde (PCFioBLH-SUS)

BLH-IFF/PCFioBLH 0004

Formulário para registro da frequência diária de não conformidades

Frequência diária de não conformidades

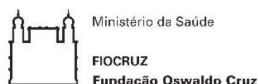
Mês: _____

Ano: _____

Data	Amostras Testadas (Total)	Amostras Reprovadas					Amostras Reprovadas (Total)	Resp.
		Embalagem	Sujidade	Cor	Flavor	Acidez		
01								
02								
03								
04								
05								
06								
07								
08								
09								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								
31								
Total								

Anexo III – Norma Técnica BLH – IFF/NT 29.21: Leite Humano Ordenhado - Determinação da Acidez Titulável:
Método Dornic

Formulário para registro mensal de não-conformidades na Seleção e Classificação do Leite Humano Ordenhado
Cru



Programa de Certificação Fiocruz em Bancos de Leite Humano para o Sistema Único de Saúde
(PCFioBLH-SUS)

BLH-IFF/PCFioBLH 0005

Formulário para Registro Mensal de Não-Conformidades na Seleção e Classificação do Leite Humano Ordenhado
Cru

FORMULÁRIO PARA REGISTRO MENSAL DE NÃO-CONFORMIDADES

Mês: _____

Ano: _____

Atributo	Amostras Reprovadas	
	Número total de amostras testadas	Porcentagem (%)
Embalagem		
Sujidade		
Cor		
Flavor		
Acidez		
Total		

Responsável: _____



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz