**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

VANESSA SILVA BOMFIM

**Perfil lipídico do concentrado com liofilizado de leite humano para alimentação de
recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso**

**Ribeirão Preto
2018**

VANESSA SILVA BOMFIM

Perfil lipídico do concentrado com liofilizado de leite humano para alimentação de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente
Opção: Investigação em Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Dr. José Simon Camelo Junior

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Bomfim, Vanessa Silva

Perfil lipídico do concentrado com liofilizado de leite humano para alimentação de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso. Ribeirão Preto, 2018.
75 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Camelo Junior, José Simon.

1. Leite humano. 2. Ácidos graxos. 3. Ácidos graxos poli-insaturados. 4. Recém-nascido de muito baixo peso. 5. Liofilização.

Nome: BOMFIM, Vanessa Silva

Título: Perfil lipídico do concentrado com liofilizado de leite humano para alimentação de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, meus pais e Cleiton pelo apoio no período de desenvolvimento desse trabalho permitindo-me concretizar mais uma vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ser caminho, verdade e luz em minha vida. Pela proteção constante e por jamais me abandonar nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais, Rubens e Georgina por todo amor, dedicação e atenção que sempre me deram e por não medirem esforços para que eu continue realizando meus sonhos. Esse trabalho também é uma vitória de vocês. Amo vocês.

Aos meus familiares, tios, primos e especialmente vovó Teresinha e vovô Euclides pela torcida e não se esquecerem de mim em suas orações. Vocês fazem diferença na minha vida.

Ao meu namorado Cleiton por estar presente nos meus dias me proporcionando momentos de alegria e também pela paciência, apoio e carinho demonstrado nos momentos em que mais precisei para concluir esse trabalho. Juntos somos fortes!

Agradeço aos profissionais que fizeram parte dessa caminhada, em especial a especialista em análises clínicas do Laboratório de Metais e Doenças Raras do HCFMRP-USP, Tânia Maria Beltramini Trevilato, por todos os ensinamentos durante o ano de aprimoramento profissional e também por ter me indicado como aluna de mestrado ao meu atencioso orientador, Prof. Dr. José Simon Camelo Júnior.

Ao meu orientador, agradeço de todo coração pelo imenso aprendizado nesses anos, atenção e educação em todas as vezes que esclareceu minhas dúvidas e discutimos sobre o nosso grandioso trabalho e principalmente por acreditar em mim como profissional. Com certeza esses anos foram essenciais para alimentar meu desejo pela pesquisa científica e acredito que a parceria não acaba por aqui, terei orgulho em continuar com a sua orientação nos próximos anos.

A todos do Banco de Leite Humano de Ribeirão Preto - HCFMRP-USP por me tratarem com muita gentileza e toda ajuda fornecida para o cumprimento desse trabalho. É um agradecimento muito especial para a coordenadora do Banco de Leite, Larissa Garcia Alves que esteve ao meu lado durante todo o desenvolvimento desse trabalho, sempre muito solícita e comprometida para ajustarmos cada detalhe que foi necessário. Foi um prazer concluir esse projeto ao seu lado. Que venham muitos outros.

As mães doadoras de leite humano que aceitaram doar um pouco do alimento dos seus bebês para que pudéssemos realizar esse estudo. Que o conhecimento gerado desse projeto possa trazer inúmeros benefícios para os recém-nascidos e que de alguma forma seja retribuído todo amor que nos foi doado.

Agradeço ao Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior e a técnica do Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, Livia Simões Ambrosio pelo acolhimento e disponibilidade em realizar as dosagens no laboratório de vocês.

A Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial ao departamento de Puericultura e Pediatria pelo ensino gratuito e de qualidade e a todos os docentes que compartilharam seus ensinamentos nas disciplinas, qualificação, palestras, entre outros momentos podendo contribuir para um melhor desenvolvimento do meu trabalho. Aos funcionários agradeço pelas instruções.

Por fim, agradeço aos meus amigos que estiveram presentes durante todo esse tempo em diversos momentos seja de estudo, aprendizado, cooperação, escuta e descontração. Em especial, Daiane, Carlos, Thaís, Michelle, Valéria, Fábio e Rafael. Com vocês foi muito mais leve e divertido. Compartilho o sucesso de mais uma etapa vencida com vocês! Muito obrigada!

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

RESUMO

BOMFIM, Vanessa Silva. **Perfil lipídico do concentrado com liofilizado de leite humano para alimentação de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso**. 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introdução Os recém-nascidos de muito baixo peso (<1.500g) necessitam de aporte adequado de nutrientes para desenvolver-se satisfatoriamente. O leite humano é fundamental na sua alimentação, já que possui uma composição nutricional balanceada que inclui nutrientes essenciais, tais como os ácidos graxos poli-insaturados, incluindo os ácidos ômega 3 e 6, de extrema importância para o desenvolvimento do sistema nervoso central e retina. No entanto, apenas o leite materno pode não ser suficiente para suprir essas necessidades, necessitando, portanto, de suplementação. Atualmente, surgiu a possibilidade de adequação do leite humano acrescido de um concentrado com liofilizado do próprio leite humano, que foi desenvolvido neste trabalho. **Objetivos** determinar a quantidade de lipídios totais e o perfil lipídico do Leite Humano *Baseline* (LHB) e dos Concentrados com o liofilizado de Leite Humano em diferentes momentos (Leite Humano concentrado no período imediato - LHCI, Leite Humano concentrado no período de 3 meses - LHC3m e Leite Humano concentrado no período de 6 meses - LHC6m). **Métodos** Foram obtidas 50 amostras de leite humano de mulheres doadoras do Banco de Leite Humano da FMRP-USP que aceitaram participar do estudo. A quantificação de lipídeos ocorreu pelo Analisador de Leite Humano MIRIS® e o perfil de ácidos graxos foi determinado por CG-FID, SHIMADZU®. **Resultados** Houve uma concentração de lipídios totais no LHCI em relação ao LHB; a concentração (% em relação ao total de ácidos graxos) dos ácidos foi de: palmítico (C16:0) 22,30% LHB, 21,46% LHCI, 21,54% LHC3m e 21,95% LHC6m ($p<0,01$); oleico (C18:1n-9) 30,41% LHB, 30,47% LHCI, 30,55% LHC3m e 29,79% LHC6m ($p=0,46$); linoléico (C18:2 n-6) 19,62% LHB, 19,88% LHCI, 19,49% LHC3m e 19,45% LHC6m ($p=0,58$); araquidônico (C20:4 n-6) 0,35% LHB, 0,16% LHCI, 0,13% LHC3m e 0,15% LHC6m ($p<0,01$); α -linolênico (C18:3 n-3) 1,32% LHB, 1,37% LHCI, 1,34% LHC3m e 1,34% LHC6m ($p=0,14$); docosahexaenóico (C22:6 n-3) 0,10% LHB, 0,06% LHCI, 0,05% LHC3m e 0,06% LHC6m ($p<0,01$). Há modificações específicas em alguns ácidos graxos, no entanto a somatória de ácidos graxos por suas classes estruturais não apresentam diferenças. **Conclusão** Apesar das pequenas diferenças encontradas no perfil lipídico, o concentrado com leite humano liofilizado é um alimento que pode vir a atender as necessidades do recém-nascido, já que houve aumento dos lipídios totais

e preservação dos nutrientes essenciais presentes apenas no leite materno, mas estudos clínicos ainda precisam ser feitos para avaliar a segurança e eficácia do concentrado como alimentação dos recém-nascidos de muito baixo peso.

Palavras-chave: Leite humano. Ácidos graxos. Ácidos graxos poli-insaturados. Recém-nascido de muito baixo peso. Liofilização.

ABSTRACT

BOMFIM, Vanessa Silva. **Fatty acids profile from the concentrate with human milk freeze-dried for feeding very low birth weight preterm infants.** 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introduction Very low birth weight infants (<1,500 g) require adequate nutrient intake to develop satisfactorily. Human milk is essential in its diet, since it has a balanced nutritional composition that includes essential nutrients, such as polyunsaturated fatty acids, including omega 3 and 6 acids, of extreme importance for the development of the central nervous system and retina. However, only breast milk may not be sufficient to meet these needs, thus requiring supplementation. Nowadays, the possibility of adapting the human milk plus a concentrate with lyophilized from the human milk itself, which was developed in this work, has arisen. **Objectives** To determine the amount of total lipids and the lipid profile of Human *Baseline* Milk (LHB) and Concentrates with human milk lyophilized at different times (Human Milk Concentrated in the immediate period - LHCI, Concentrated Human Milk in the 3-month period - LHC3m and Human Milk Concentrated in the 6-month period - LHC6m). **Methods** Fifty samples of human milk from women donors of the Human Milk Bank of FMRP-USP who were accepted to participate in the study were obtained. Lipid quantification was performed by the MIRIS® Human Milk Analyzer and the fatty acid profile was determined by CG-FID, SHIMADZU®. **Results** There was a total lipid concentration in LHCI relative to LHB; the concentration (% of total fatty acids) of the acids was: palmitic (C16: 0) 22.30% LHB, 21.46% LHCI, 21.54% LHC3m and 21.95% LHC6m ($p < 0.01$); oleic acid (C18: 1n-9) 30.41% LHB, 30.47% LHCI, 30.55% LHC3m and 29.79% LHC6m ($p = 0.46$); linoleic acid (C18: 2 n-6) 19.62% LHB, 19.88% LHCI, 19.49% LHC3m and 19.45% LHC6m ($p = 0.58$); arachidonic (C20: 4 n-6) 0.35% LHB, 0.16% LHCI, 0.13% LHC3m and 0.15% LHC6m ($p < 0.01$); α -linolenic acid (C18: 3 n-3) 1.32% LHB, 1.37% LHCI, 1.34% LHC3m and 1.34% LHC6m ($p = 0.14$); (C22: 6 n-3) 0.10% LHB, 0.06% LHCI, 0.05% LHC3m and 0.06% LHC6m ($p < 0.01$). There are specific modifications in some fatty acids, however the sum of fatty acids by their structural classes do not present differences. **Conclusion** Despite the small differences found in the lipid profile, the concentrate with freeze-dried human milk is a food that can meet the needs of the newborn, since there was an increase in total lipids and preservation of essential nutrients present only in breast milk, but

clinical studies still need to be done to evaluate the safety and efficacy of concentrate as a feed for very low birth weight infants.

Keywords: Human milk. Fatty acids. Polyunsaturated fatty acids. Very low birth weight infants. Freeze-drying.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias metabólicas biossintéticas dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFAs) a partir dos ácidos graxos essenciais ácido linoléico (C18:2 ω -6) e ácido α - linolênico (C18:3 ω -3).....	24
Figura 2 - Box plot da quantidade de lipídios totais.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Característica das mães do estudo.....	38
Tabela 2 - Valores de lipídios totais nas amostras de LHB, LHCI, LHC3m e LHC6m.....	38
Tabela 3 - Valores comparativos de lipídios totais nos diferentes tempos de análise.....	39
Tabela 4 - Macronutrientes analisados pelo Analisador de Leite Humano MIRIS®, além dos lipídios totais.	40
Tabela 5 - Perfil lipídico completo das amostras de LHB, LHCI, LHC3m e LHC6m, expressos em porcentagem (%) em relação ao total de ácidos graxos identificados.....	41
Tabela 6 - Diferença estatística nos diferentes tempos dos ácidos graxos saturados (SFAs).....	43
Tabela 7 - Diferença estatística nos diferentes tempos dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs).....	45
Tabela 8 - Diferença estatística nos diferentes tempos dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs).....	47
Tabela 9 - Resumo da composição de ácidos graxos por classe estrutural.....	47

LISTA DE SIGLAS

AG	Ácidos graxos
ARA	Ácido araquidônico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
DHA	Ácido docosahexaenóico
DHA-TAG	Ácido docosahexaenóico com triacilglicerol
LA	Ácido linoléico
LC-PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa
LH	Leite humano
LHB	Leite humano <i>baseline</i>
LHCI	Concentrado com liofilizado de Leite Humano no período imediato
LHC3m	Concentrado com liofilizado de Leite Humano no período de 3 meses
LHC6m	Concentrado com liofilizado de Leite Humano no período de 6 meses
LNA	Ácido α -linolênico
MUFAs	Ácidos graxos monoinsaturados
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
PUFAs ω -3	Ácidos graxos poli-insaturados da classe ômega 3
PUFAs ω -6	Ácidos graxos poli-insaturados da classe ômega 6
RN	Recém-nascido
RNMBP	Recém-nascido de muito baixo peso
RNPT	Recém-nascido pré-termo
RNT	Recém-nascido a termo
SFAs	Ácidos graxos saturados

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Leite Humano.....	19
1.2 Fórmulas infantis.....	21
1.3 Ácidos Graxos (AG).....	23
1.3.1 DHA e ARA.....	25
1.4 Leite Humano Concentrado.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Coleta de Leite Humano.....	30
3.1.1 Controle de Qualidade Físico-Químico.....	31
3.1.1.1 Processo de seleção.....	31
3.1.1.1.1 Condições de embalagem.....	31
3.1.1.1.2 Verificação de sujidades.....	31
3.1.1.1.3 Verificação de cor.....	32
3.1.1.1.4 Verificação de <i>off-flavor</i>	32
3.1.1.1.5 Determinação de Acidez Dornic.....	32
3.1.1.2 Processo de classificação.....	32
3.1.1.2.1 Verificação do período de lactação.....	32
3.1.1.2.2 Conteúdo energético - crematócrito.....	33
3.2 Obtenção do Concentrado com o liofilizado de Leite Humano.....	33
3.2.1 Liofilização.....	33
3.2.2 Reconstituição.....	34
3.3 Pasteurização.....	34
3.4 Controle de Qualidade Microbiológico.....	35
3.5 Análise dos Lipídios Totais.....	35
3.6 Perfil Lipídico.....	36
3.7 Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1 Características das doadoras de leite humano.....	38
4.2 Acidez Dornic e Crematócrito.....	38
4.3 Controle de Qualidade Microbiológico.....	38
4.4 Lipídios Totais.....	38

4.5 Análise de macronutrientes.....	40
4.6 Perfil Lipídico.....	40
4.6.1 Ácidos graxos saturados (SFAs).....	42
4.6.2 Ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs).....	45
4.6.3 Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs).....	46
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS.....	66
ANEXO A: Termo de consentimento.....	66
ANEXO B: Box plots.....	67

1. INTRODUÇÃO

A nutrição neonatal, especialmente dos recém-nascidos prematuros é alvo de estudos e avançou consideravelmente nos últimos anos, em decorrência, principalmente, da maior sobrevivência de recém-nascidos pré-termo cada vez menores. Essas taxas de sobrevivência e a qualidade de vida de recém-nascidos pré-termo, em especial dos de muito baixo peso, assim considerados os de peso ao nascer menor do que 1.500g têm melhorado significativamente devido aos progressos técnico-científicos incorporados à assistência dessas crianças. (WEGMAN, 2001) (HARDING et al., 2017)

Com a progressão dos cuidados na atenção nutricional dos recém-nascidos pré-termo, um dos maiores objetivos a serem atingidos nessa área é expandir as taxas de sobrevivência e tentar simular o crescimento fetal para intensificar os resultados obtidos principalmente no desenvolvimento neurológico. (MCNELIS et al., 2017)

Cabe destacar que os recém-nascidos pré-termo (RNPT) são aqueles nascidos antes da 37ª semana de gestação. Já os recém-nascidos a termo (RNT) são aqueles nascidos no intervalo entre o começo do primeiro dia, da 37ª semana de gestação e o fim do último dia, da 42ª semana de gestação. (EUCLYDES, 2014)

Os recém-nascidos prematuros nascem em um momento em que perdem uma parte ou todo o terceiro trimestre de gestação, caracterizado por grande desenvolvimento fetal mediante o aumento de massa óssea, massa muscular e acúmulo de gordura que ocorre pela transferência de nutrientes via placenta. Se esse feto ainda estivesse no útero materno estaria crescendo muito rapidamente. (NEWELL, 2000) (HARDING et al., 2017)

O seu nascimento precoce representa uma emergência nutricional, já que as altas taxas de nutrientes que provinha do fluxo placentário devem ser substituídas. A nutrição parenteral auxilia nas necessidades de abastecimento de energia e nutrientes durante a vida pós-natal até a alimentação enteral ser estabelecida. É necessário uma ingestão muito maior de energia, proteína e outros nutrientes do que seria necessário para o crescimento dos nascidos a termo. (HARDING et al., 2017)

Os recém-nascidos de muito baixo peso (RNMBP) possuem deficiências em muitos nutrientes importantes e essenciais para o seu desenvolvimento como o ferro, zinco, cálcio, vitaminas e com pouca ou nenhuma gordura subcutânea e estoque de glicogênio. Além do mais, muitas vezes, a anatomia do trato digestivo do recém-nascido (RN) se completou, porém ainda não houve maturação da sua função. Novas práticas nessa atenção nutricional

neonatal incluem recomendações para aumentar o fornecimento de proteínas, melhorar as formulações de lipídios parenterais e fornecer suplementação de minerais ao incentivar a alimentação de leite humano. (HARDING et al., 2017)

1.1 Leite humano

O leite humano possui uma composição nutricional balanceada que inclui todos os nutrientes essenciais, além de cerca de 250 ou mais tipos diferentes de fatores bioativos; muitos desses fatores parecem contribuir para o crescimento e desenvolvimento do recém-nascido, bem como para a maturação de seu trato gastrointestinal. Dentre eles destacam-se fatores antimicrobianos, agentes anti-inflamatórios, enzimas digestivas, vários tipos de hormônios, fatores de crescimento e imunomoduladores. (KUNZ et al., 1999) (AGOSTONI et al., 2010) (ANDREAS et al., 2015)

Os benefícios da alimentação com o leite materno são numerosos e incluem tanto aspectos psicológicos, econômicos, ecológicos como aspectos nutricionais superiores. Reconhecido largamente como a melhor fonte de nutrição para recém-nascidos prematuros, o leite humano deve fazer parte da dieta dos RNMBP. (ERICK, 2018)

Sendo o leite materno o alimento ideal para qualquer RN, devido as suas funções fisiológicas, bem como suas qualidades nutricionais e imunológicas, também permite a formação e o fortalecimento do vínculo afetivo entre a mãe e o bebê. (GUBERT et al., 2012) Quando possível, deve-se oferecer ao RNPT preferencialmente o leite da própria mãe, devido a melhor adaptação fisiológica e a vantagem da passagem de anticorpos contra patógenos específicos do ambiente em que ele se encontra. Porém não apenas no início da vida pós-natal e sim se estendendo ao longo do primeiro ano de vida. Essas são qualidades que para os RNPT são de grande relevância já que esses apresentam condições iniciais de vida mais vulneráveis. (REZENDE et al., 2014)

As inúmeras vantagens do leite materno levaram a criação de Bancos de Leite Humano para fornecer o alimento quando o próprio leite da mãe não está disponível para o seu bebê. O leite humano doado para alimentação de RNPT passa por processos de pasteurização e armazenamento que podem levar a perdas variáveis de nutrientes, incluindo os lipídios. (MEREDITH-DENNIS et al., 2018) Normalmente, os leites humanos doados provem de mães com período de lactação mais tardia (leite maduro) e que tiveram filhos a termo, consequentemente tendo um leite de composição diferente das mães que tiveram partos prematuros, já que o leite humano de mães de recém-nascidos pré-termo contém maiores

concentrações de proteína, sódio, zinco e cálcio do que leite maduro, de maneira transitória. (TUDEHOPE, 2013) (RAITEN et al., 2016)

Há uma crescente disponibilidade do leite humano de banco em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal e este precisa ser introduzido nessas unidades com uma significativa manipulação, apresentando riscos no processo de controle de qualidade e consequentemente no fornecimento de nutrição para os RN. Em se tratando de um paciente que normalmente se encontra em situações vulneráveis é necessário padronizar e garantir que o serviço de doação de leite humano seja seguro e confiável, otimizando os processos de coleta, armazenamento e entrega do leite humano de banco para os RNPT. (KIM et al., 2013) (HARTMANN, 2017)

A preocupação em fornecer nutrientes ao RNPT justifica-se também pela necessidade de promover crescimento e desenvolvimento físicos semelhantes à idade gestacional intrauterina. (HIGGINS et al., 2012)

Apesar dos inúmeros benefícios já citados na literatura sobre o aleitamento materno exclusivo, vários autores demonstraram que os RNPT alimentados exclusivamente com leite humano, apresentaram taxas de crescimento mais baixas do que aquelas observadas na vida intrauterina. (KANMAZ et al., 2013) Desde que tais recém-nascidos não suportam grandes volumes de leite devido à sua imaturidade metabólica, necessitam, portanto, de suplementação com misturas multinutrientes com origem na proteína hidrolisada do leite de vaca ou mistura com fórmulas infantis específicas para RNPT.

Tais fortificantes ou aditivos do leite humano aumentam o teor de proteínas, calorias, minerais, micronutrientes e eletrólitos, auxiliando nas deficiências nutricionais e no aumento das taxas de crescimento desses prematuros. (SCHANLER, 2001) No entanto, por estes serem aditivos com proteína em origem heteróloga, podem causar reações adversas como sensibilização e casos de enterocolite necrosante devido à alta osmolaridade desses compostos. (HAY JR et al., 1999) (SULLIVAN et al., 2010)

A nutrição do RNMPB representa um desafio à equipe profissional envolvida em seus cuidados, devido às condições metabólicas instáveis e ao risco elevado de complicações associadas à imaturidade do sistema digestivo. (REZENDE et al., 2014)

É importante que se questione os possíveis efeitos deletérios da utilização de aditivos do leite humano à base de proteína heteróloga no aumento da osmolaridade do leite humano para valores indesejáveis, que elevam o risco de ocorrência de enterocolite necrosante, vômitos, problemas de motilidade gastrointestinal, alergia à proteína heteróloga e tornam o seu uso inadequado. (KREISSL et al., 2013)

Em 2013 um estudo feito por Cristofalo et al., a incidência de enterocolite necrosante entre recém-nascidos de extremo baixo peso que se alimentaram exclusivamente por fórmula baseada em leite de vaca foi de 21% *versus* 3% dos que tiveram alimentação exclusiva com leite humano fortificado com aditivo comercial de origem humana (Prolact+ H2MF; Prolacta Bioscience). Além de terem apresentado uma diferença significativa na mediana dos dias com nutrição parenteral, 36 *versus* 27 dias, respectivamente. (CRISTOFALO et al., 2013)

1.2 Fórmulas infantis

Já na década de 1940 havia evidências de que RNPT necessitavam de uma suplementação do leite humano com proteínas e minerais, particularmente de cálcio e fósforo, para garantir o ganho de peso, comprimento e crescimento ósseo adequado vindo de observações clínicas e ensaios dietéticos em RNPT. (SENTERRE, 2014)

Conforme revisto por Greer (2001) e Klein (2002), o desenvolvimento comercial de fórmulas especiais, enriquecidas com nutrientes para os RNMPB expandiu-se nas décadas de 1970 e 1980. Estas fórmulas pré-termo continham quantidades relativamente elevadas de gorduras, sódio, cálcio, fósforo e vitaminas para atender às necessidades do recém-nascido pré-termo que não tolerava grandes volumes de leite. (GREER, 2001) (KLEIN, 2002)

A composição dessas fórmulas para lactentes é baseada na composição do leite humano, porém as estruturas dessas matrizes são diferentes. (CHATTERTON et al., 2004) Em relação aos lipídios, por exemplo, o tamanho da dispersão entre os glóbulos de gordura e a natureza da sua interface do leite humano e das fórmulas difere notavelmente. (MICHALSKI et al., 2005) As fórmulas infantis são baseadas em glóbulos de gordura de 0,5 μm (distribuição 0,1-1 μm), enquanto que as do leite humano contém glóbulos maiores de 4 μm (distribuição 0,1-10 μm). Esses glóbulos de gordura do leite humano são estabilizados por uma membrana de três camadas herdadas da glândula mamária. A membrana tem uma composição típica da membrana celular dos mamíferos (fosfolípides, esfingolipídios, colesterol, proteínas e enzimas). Ao contrário dos glóbulos de gordura das fórmulas que são estabilizadas por uma membrana formada à base de caseína e proteínas presentes no soro do leite. (LOPEZ et al., 2010)

Estudos recentes sugerem que essas diferenças na estrutura da interface dos glóbulos entre leite humano e as fórmulas para lactentes são elementos-chave responsáveis pelos benefícios do aleitamento materno, como a proteção contra a síndrome metabólica e obesidade. (OOSTING et al., 2014) Em paralelo, a digestão dos lipídeos é afetada pela

diferença dessas estruturas, sendo a digestão e absorção da gordura do leite humano facilitada devido à complexa organização dos seus glóbulos e o predomínio de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFAs), como o ácido araquidônico (ARA), ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA) e também por conter lipase estimuladora dos sais biliares. (CAMELO JR; MARTINEZ, 2005) (CALDER, 2016)

Nas fórmulas são adicionados os LC-PUFAs, em especial o ARA e DHA e há um conhecido benefício clínico quanto a isso. Como observado por Richard et al, 2016 o equilíbrio entre esses ácidos tem um importante papel imunomodulador durante o período pós-natal, quando o sistema imunológico está se desenvolvendo rapidamente. (RICHARD et al., 2016) O DHA está presente no leite materno e estudos controlados randomizados indicam melhorias em curto prazo na função cognitiva dos prematuros e no desenvolvimento do sistema imunológico. (HAY JR; HENDRICKSON, 2017)

A composição das moléculas de DHA com triacilglicerol (DHA-TAG) são diferentes se comparadas com o leite bovino, leite humano e fórmulas. Há também diferenças entre as marcas das fórmulas. O leite bovino e o leite humano contem DHA-TAG de menor massa molecular (728-952 Da), enquanto que algumas fórmulas contem espécies de maior massa (de 728 a 1035 Da). Essa diversidade de espécies moleculares nos diferentes tipos de leite e fórmulas podem afetar o perfil nutricional e suas funções biológicas. (LIU et al., 2016)

O aprimoramento dessas fórmulas para alimentação dos RNPT é importante e deve proporcionar cada vez mais, melhores resultados. De acordo com o estudo de Carver, 2003, os LC-PUFAs adicionados nas fórmulas em quantidades semelhantes às do leite humano produziram concentrações teciduais desses compostos mais elevadas e aparentemente uma melhor acuidade visual. (CARVER, 2003)

Ainda assim, mesmo quando há comparação entre as fórmulas enriquecidas com ARA/DHA e o leite humano, em relação a melhora no desenvolvimento cerebral e uma melhor acuidade visual, temos evidências de que os nutrientes ofertados pelo leite humano são superiores. (MENA, 2008)

Apesar do crescente desenvolvimento das fórmulas, o uso delas ainda traz riscos, particularmente aqueles derivados da proteína do leite de vaca. A alimentação de RNPT com fórmulas ajuda a garantir a entrega consistente de nutrientes. No entanto, o equilíbrio entre os riscos e os benefícios da alimentação ainda é incerto, devido à preocupação com o aumento dos riscos de enterocolite e aumento das taxas de sepse em lactentes que recebem fórmulas pré-termo. (SULLIVAN et al., 2010) (ABRAMS et al., 2014) (HAY JR; HENDRICKSON, 2017)

1.3 Ácidos graxos (AG)

Nas últimas décadas, tem sido dada uma atenção especial à composição e aos aspectos fisiológicos da fração lipídica do leite humano. (KOLETZKO et al., 2001) (UAUY; CASTILLO, 2003) A porção lipídica do leite materno contribui com 40 a 55% do total de energia ingerida, e provê nutrientes essenciais tais como vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos poli-insaturados, incluindo o ácido linoléico (LA) (C18:2 ω -6) e o α -linolênico (LNA) (C18:3 ω -3). (INNIS, 2003)

Os ácidos graxos que compõem os lípidios do leite humano são moléculas participantes da estrutura das gorduras, representando importantes funções no organismo humano como fontes energéticas, constituintes das membranas celulares e precursores de moléculas de sinalização celular, além de atuar diretamente na sinalização. (INNIS, 2003)

Do ponto de vista estrutural, os ácidos graxos podem ser classificados como: ácidos graxos saturados (sem ligações duplas, exemplo: ácido palmítico, C16:0), ácidos graxos monoinsaturados (com uma dupla ligação, exemplo: ácido oléico, C18:1 ω -9) e ácidos graxos poli-insaturados (com duas ou mais ligações duplas, exemplo: ácido linoléico, C18:2 ω -6 e ácido α -linolênico, C18:3 ω -3), sendo as moléculas de AG com mais de 20 carbonos, considerados de cadeia longa (exemplo: ácido docosahexaenóico e o ácido araquidônico, que são LC-PUFAs). (KUS; FILHO, 2010) (GONZÁLEZ; VISENTIN, 2016)

A presença de duplas ligações aumenta a flexibilidade da molécula e consequentemente a fluidez da membrana celular da qual faz parte. Desta forma, quanto maior o número de duplas ligações, maior a fluidez e consequentemente, a comunicação intracelular. (CARLSON et al., 2013)

Os ácidos graxos saturados e monoinsaturados podem ser sintetizados no organismo, porém os ácidos graxos poli-insaturados, notadamente o LA e LNA, por não serem sintetizados pelo organismo constituem-se em ácidos graxos essenciais. (INNIS, 2004)

Os ácidos LA e LNA possuem diferentes funções biológicas e são precursores de LC-PUFAs da classe ω -6 e ω -3, respectivamente e são formados a partir de processos de alongação e dessaturação, catalisadas por enzimas. (Figura 1). As enzimas de alongamento, chamadas elongases, adicionam pares de carbono à cadeia acil crescente. Enquanto as enzimas dessaturases inserem ligações duplas no grupo acil. Acredita-se que essas reações ocorrem principalmente no fígado, na região do retículo endoplasmático, mas há evidências de que há expressão gênica para codificação dessas enzimas em outros tecidos, como o cérebro e testículos. (CALDER, 2016)

Figura 1 - Vias metabólicas biossintéticas dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFAs) a partir dos ácidos graxos essenciais ácido linoléico (C18:2 ω -6) e ácido α -linolênico (C18:3 ω -3). Modificado de: KOLETZKO B et al. Physiological Aspects of Human Milk Lipids and Implications for Infant Feeding: A Workshop Report. Acta Paediatr. 2011; 100(11):1403-15.

Embora essas enzimas tenham maior afinidade pelos ácidos da família ômega 3 (LNA, C18:3 ω -3), a sua conversão em DHA é fortemente influenciada pelos níveis de ômega 6 (LA, C18:2 ω -6) na dieta. Os LA e LNA competem pelas mesmas enzimas alongases e dessaturases, o que reforça a importância de um aporte balanceado entre ácidos graxos ω -3 e ω -6, sendo aconselhável manter uma adequada razão ômega-6/ômega-3 (LA/LNA). (KUS; FILHO, 2010) (KOLETZKO *et al.*, 2011) (CARLSON *et al.*, 2013)

A proporção de ARA para DHA no leite humano é geralmente 1,5-2/1, mas a variabilidade é alta. Essa proporção é determinada principalmente pela dieta habitual da região ou do país. (SHERRY; OLIVER; MARRIAGE, 2015)

Em 2015 no estudo de Alshweki et al, os autores analisaram RNMBP que recebiam fórmulas contendo diferentes razões ω -6/ ω -3 e conclui-se que os recém-nascidos pré-termo que receberam fórmula com uma razão ω -6/ ω -3 de 2/1 tiveram níveis sanguíneos mais elevados de ácidos graxos essenciais durante o primeiro ano de vida e melhor desenvolvimento psicomotor, em comparação com recém-nascidos muito prematuros que consumiram fórmula com uma razão ω -6/ ω -3 de 1/1. (ALSHWEKI et al., 2015)

1.3.1 DHA e ARA

Os LC-PUFAs sintetizados a partir dos ácidos graxos essenciais são de extrema importância para os recém-nascidos, principalmente o DHA e o ARA, que estão presentes nos fosfolípidios das membranas celulares, influenciando na estrutura, função, sinalização, expressão gênica. (KOLETZKO et al., 2011)

O DHA além de exercer efeito positivo no crescimento infantil, é o LC-PUFAs com maior presença nos segmentos da retina (cones e bastonetes). Aproximadamente 10% do peso do cérebro e 50% do peso seco são formados por lipídios, sendo metade fosfolípidios. Os fosfolípidios da massa cinzenta do cérebro contêm grandes proporções de DHA e ARA. Altas concentrações de DHA na retina, e de DHA e ARA na massa cinzenta do cérebro sugerem que estes ácidos graxos têm importante função no processo visual e neural. (INNIS, 2004) (LIMA et al., 2004) (JENSEN et al., 2005)

O DHA é um ácido poli-insaturado da classe ômega 3 e o ARA um ácido poli-insaturado da classe ômega 6 que podem ser sintetizados a partir do ácido α -linolênico e ácido linoléico, respectivamente ou obtido diretamente da dieta. O LNA e LA são encontrados principalmente em folhas verdes, algumas nozes, sementes e óleos vegetais ou alimentos contendo esses ingredientes. (CALDER, 2016)

O DHA desempenha papéis vitais na estrutura e na função da retina e do cérebro tendo papel particularmente importante na mielinização e formação de sinapses cerebrais, durante a vida fetal e na infância. (CALDER, 2016) Esse importante ácido graxo é encontrado na natureza em frutos do mar, especialmente peixes oleosos e em suplementos de óleo de peixe e algas, também sendo identificado em altas concentrações no leite materno, em média 0,35% do total lipídico, sendo 20% esterificado em fosfolípidios, o que leva à adição do DHA, ao lado do ARA, em fórmulas infantis como um diferencial para o desenvolvimento do metabolismo e sistemas cerebral e imune do lactente. (BELKIND-GERSON et al., 2008)

A ingestão dietética de alimentos de origem marinha é extremamente variável e explica a larga faixa de variação do DHA no leite humano, embora a concentração média esteja em cerca de 0,33%. (KOLETZKO et al., 2011) (CARLSON et al., 2013)

O ARA é um componente-chave das membranas celulares e é um dos ácidos graxos mais abundantes no cérebro, ajudando a manter a fluidez da membrana celular do hipocampo, a proteger de estresse oxidativo e ativa uma proteína (Syntaxina-3 STX-3) envolvida no crescimento e reparação de neurônios. (FUKAYA et al., 2007) (WANG et al., 2006) (DARIOS; DAVLETOV, 2006) Também é um precursor de eicosanóides e outras moléculas

sinalizadoras. Nos alimentos são encontrados em carnes, ovos e miúdos. (BRENNAN, 2011) (CARLSON et al., 2013)

O feto é capaz de formar DHA, no entanto, as enzimas necessárias para levar a conversão dos ácidos essenciais em seus respectivos LC-PUFAs estão em pequena quantidade no fígado fetal, além de sua imaturidade para tal reação. Portanto, após o nascimento, o RN só consegue uma taxa de conversão de LA em ARA <5% e de LNA em DHA <0,5%. De maneira interessante, não existe o mesmo desafio fisiológico na produção de ARA a partir de LA que possui uma capacidade de conversão 10 vezes maior em comparação com a capacidade de conversão de LNA em DHA. (KOLETZKO et al., 2011)

Esse fato suporta a importância do DHA por si e não apenas a utilização do seu precursor ω -3 LNA na dieta da gestante e lactante (CARLSON et al., 2013).

Antes do nascimento, os ácidos graxos essenciais necessários para o desenvolvimento fetal devem ser obtidos da dieta e reservas maternas e transferidos via placenta na forma de LC-PUFAs. Depois do nascimento originam-se do leite materno quando a amamentação materna for exclusiva, já que o DHA e ARA não estão presentes no leite de vaca. (FLEITH; CLANDININ, 2005)

O leite humano é composto pelas escolhas alimentares da mãe. Seus hábitos alimentares nos períodos pré-gestação, na gestação e pós-gestação afetam e muito o perfil nutricional do leite humano. (ERICK, 2018) Uma dieta rica em carboidratos irá favorecer a síntese endógena dos ácidos graxos de cadeia curta e média e uma dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados, presente em peixes, leite, carne e ovos, irão determinar maiores níveis destes no leite secretado. A qualidade dos lipídios da dieta materna tem influência direta no perfil de ácidos graxos do leite secretado. (CUNHA et al., 2005)

Por exemplo, as concentrações de LA e LNA (essenciais) no leite materno podem variar entre 10-24% (LA) e 0,6-1,9% (LNA), de acordo com esses hábitos alimentares. O aumento do aporte materno de LA nos últimos 60 anos é refletido por aumento desse ácido graxo no leite materno em observações realizadas nos Estados Unidos. As concentrações do LNA mantiveram-se relativamente estáveis, o que alterou consideravelmente a relação LA/LNA (ω -6/ ω -3) de 6-8% antes de 1970 para aproximadamente 14-16% desde 1980. (KOLETZKO et al., 2011) (CARLSON et al., 2013)

A placenta por si própria pode modular o gradiente de concentração dos ácidos graxos entre o sangue materno e fetal. Essa transferência preferencial é chamada de biomagnificação ou bioamplificação, com a predominância de ARA materno consumido pelo feto primariamente no início da gestação, seguido pelo DHA no terceiro trimestre e período pós-

parto durante a lactação. Estudos com carbono marcado (^{13}C) demonstram que o DHA é preferencialmente transferido pela placenta, de maneira significativamente superior aos ácidos linoléico, oléico e palmítico, a partir do sangue materno para a circulação fetal. (HAGGARTY, 2004) (KOLETZKO et al., 2007)

Da mesma maneira, o leite materno transfere preferencialmente os LC-PUFAs ARA e DHA, como um *continuum* do processo de bioamplificação placentária, processo exclusivo da espécie humana. Sabemos que a composição do leite é única para cada espécie. O leite humano contém aproximadamente 38g/L de gordura, semelhante ao leite de vaca, mas se comparado ao leite de ratos, esse possui cerca de 150g/L. (CLEMENS; HERNELL; MICHAELSEN, 2011) Vale reforçar que o leite de vaca não possui esses referidos LC-PUFAs. Aproximadamente 110 mg/dia de DHA são transferidos diariamente pelo leite materno, sendo cerca de 20% desse DHA na forma de fosfolipídios, que são melhor absorvidos e incorporados pelo recém-nascido (KOLETZKO et al., 2011).

1.4 Leite Humano Concentrado

Os ácidos graxos presentes no leite humano são fonte de energia para o neonato e essenciais para o seu desenvolvimento cerebral, pois participam do processo de mielinização e crescimento dos neurônios, atuando também na retina e sendo substância-chave para formação da membrana celular. (MARTINEZ; CAMELO JR, 2001)

Martinez et al. (MARTINEZ et al., 1987) descreveu em um estudo que perdas significativas de nutrientes podem ocorrer na alimentação por sonda, especialmente dos lipídios, devido ao tamanho variado dos glóbulos de gordura, maiores que 4 μm que ficam aderidas aos tubos da sonda. Além da perda energética do leite humano ofertado para o recém-nascido, muitos nutrientes importantes são associados com a gordura do leite, por exemplo, as vitaminas lipossolúveis. Portanto, essa perda de gordura é uma real preocupação com possíveis repercussões sobre o crescimento e desenvolvimento dos recém-nascidos. A separação da gordura pode ser evitada pela homogeneização por ultrassom em baixa escala, dando maior estabilidade a esse homogeneizado, minimizando a perda.

Atualmente, surgiu a possibilidade de adequação do leite humano acrescido de um concentrado com liofilizado do próprio leite humano. Com isso minimizam-se as reações adversas se comparado a um aditivo de origem heteróloga, capaz de provocar sensibilização e devido a sua alta osmolaridade pode desencadear uma enterocolite necrosante no recém-

nascido. A utilização de leite humano concentrado com liofilizado de origem humana homogeneizado pode incrementar o teor de gordura do leite ofertado ao RNMBP.

É importante conhecer o perfil lipídico do leite que será oferecido para o recém-nascido, em especial a qualidade desses ácidos graxos, já que os LC-PUFAs são considerados essenciais para o desenvolvimento cerebral dos recém-nascidos pré-termo e também influenciam diretamente na acuidade visual e sistema imunológico infantil. (NISHIMURA et al., 2013) Assim, se justifica a tentativa de obter esse concentrado com liofilizado de leite humano para benefícios na alimentação do recém-nascido de muito baixo peso, que terá a introdução indispensável dos compostos essenciais presentes somente no leite humano, como também a minimização dos efeitos adversos que podem ser causados pelo aditivos de proteína heteróloga.

2. OBJETIVOS

1. Determinar a quantidade de lipídios totais e o perfil lipídico das amostras de Leite Humano *Baseline* (LHB) e do Concentrado com o liofilizado de Leite Humano no período imediato (LHCI) e pós-estocagem de 3 (LHC3m) e 6 (LHC6m) meses.

2. Avaliar a estabilidade nutricional do Concentrado com liofilizado de Leite Humano no período imediato e pós-estocagem com 3 e 6 meses.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo experimental pré-clínico é parte do Projeto: Elaboração de um Concentrado com Liofilizado de Leite Humano para Alimentação de Recém-nascidos Pré-termo de Muito Baixo Peso, que teve como objetivo elaborar um concentrado com liofilizado do leite humano e conhecer a sua composição nutricional quanto aos teores de proteínas, carboidratos, lipídios, energia, osmolaridade, sódio, potássio, cálcio, fósforo, magnésio e o perfil de ácidos graxos (em especial, LC-PUFAs e ácidos graxos essenciais, linoleico e alfa-linolênico) para ser usado na alimentação de RNMPB. Este estudo foi financiado pela Fundação Bill e Melinda Gates, CNPq e DECIT / Ministério da Saúde do Brasil.

Por se tratar de um estudo com material biológico humano, essa pesquisa foi submetida e aprovada pela avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Número do Parecer: 738.080).

Parte do desenvolvimento do projeto de pesquisa foi realizada no Banco de Leite Humano da Faculdade de Medicina de Ribeirão - USP e no Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

3.1 Coleta de Leite Humano

As doadoras de leite humano foram esclarecidas quanto à natureza do estudo e convidadas a participar do mesmo. As que aceitaram a participação no projeto assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A), passando também por uma triagem clínica e sorológica, como de praxe das doadoras do Banco de Leite. A partir disso, as doadoras foram instruídas em como realizar a massagem e ordenha das mamas para retirada do leite humano em frasco de vidro inerte, esterilizado, fornecido pelo Banco de Leite.

Para o cálculo amostral, considerando-se o valor de 0,36 para o desvio padrão com relação à média de proteína concentrada (2,20) e valor de erro absoluto de 0,1, com nível de confiança de 95%, foram necessárias 50 doadoras. Os critérios de inclusão foram leite humano maduro (período de lactação maior do que 15 dias) com acidez Dornic até 8°D. Os critérios de exclusão utilizados foram o período de lactação inferior a 15 dias e a acidez Dornic maior do que 8°D.

Foram obtidos 400 ml de leite humano maduro de cada doadora. Esse leite foi obtido através de coleta domiciliar, na qual as mães tinham até 10 dias para coleta do leite. Apesar de ser um volume alto é importante salientar que em momento algum o estoque do Banco de

Leite Humano foi prejudicado. As coletas para todo o estudo foram realizadas de acordo com a demanda que tínhamos de leite humano doado e perdurou por mais de 1 ano.

Os leites das 50 mães foram divididos em 4 tempos diferentes para análise: 50 amostras de Leite Humano *Baseline* (LHB), 50 do Concentrado com o liofilizado de Leite Humano no período imediato (LHCI), 50 de pós-estocagem de 3 meses (LHC3m) e 50 de pós-estocagem 6 meses (LHC6m), totalizando 200 amostras.

O leite humano doado foi encaminhado para a sala de processamento do Banco de Leite, no qual foi congelado, para posteriormente serem realizados os procedimentos de controle de qualidade físico-químico, obtenção do Concentrado com o liofilizado de leite humano, pasteurização e controle de qualidade microbiológico.

Todos os procedimentos realizados envolvendo o leite humano seguem a rotina preconizadas pela Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano.

3.1.1 Controle de Qualidade Físico-Químico

Todas as amostras passaram pelos processos de seleção e classificação preconizados pela Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano. A seleção compreende: condições da embalagem, presença de sujidades, cor, off-flavor e acidez Dornic. A classificação compreende a verificação de: período da lactação, acidez Dornic e conteúdo energético – creatinócrito. (FIOCRUZ, 2003) (SILVA, 2004) (BRASIL, 2006) (ESCUDEIR-VIECO et al., 2016) (HAIDEN; ZIEGLER, 2016) (PICAUD; BUFFIN, 2017)

3.1.1.1 Processo de seleção

3.1.1.1.1 Condições da embalagem

O leite humano doado foi acondicionado em recipientes de vidro, estéreis, com boca larga e tampa plástica rosqueável. Tem-se com isso o intuito de armazenar o leite em material inerte e inócuo em temperaturas baixas e altas e de não permitir trocas indesejáveis com o produto, assim mantendo o seu valor biológico. (BRASIL, 2006)

3.1.1.1.2 Verificação de sujidades

Foi feita a avaliação se continha algum corpo estranho no leite. São considerados exemplos: pelos, cabelos, fragmentos de pele, fragmentos de unha, insetos, pedaços de papel, vidro, etc.

3.1.1.1.3 Verificação da cor

O leite foi avaliado quanto a sua coloração. São considerados aceitáveis aqueles leites que apresentam coloração que varie do esbranquiçado ao amarelo mais intenso, podendo passar pelo esverdeado e azulado. A coloração do leite pode variar dependendo do momento da ordenha. (FIOCRUZ, 2003) (SILVA, 2004)

3.1.1.1.4 Verificação de *off-flavor*

Off-flavor é a característica organoléptica não conforme com o aroma original do leite humano ordenhado. A sua determinação se configura como importante instrumento de detecção de não-conformidades, sobretudo as que ocorrem do crescimento de microrganismos pertencentes à microbiota secundária do leite, ocasionando alterações físico-químicas em sua composição. (FIOCRUZ, 2003) (BRASIL, 2006). Exemplos: rancificação, peixe ou ovo em fase de decomposição, cloro, plástico, remédio.

O frasco de vidro foi agitado em campo de chama, com alto rigor microbiológico e após a remoção da tampa foi inspirado o seu odor.

3.1.1.1.5 Determinação da Acidez Dornic

A acidez Dornic do leite humano ordenhado é a acidez titulável expressa em graus Dornic (BRASIL, 2006).

Para a determinação da acidez titulável do leite humano, foi utilizada a solução titulante que é o hidróxido de sódio 0,1N, também conhecido como Solução Dornic. Cada 0,01ml gasto para neutralizar 1 ml de leite humano ordenhado correspondeu a 1°D (um grau Dornic). (ALMEIDA et al., 1998) (ESCUDER-VIECO et al., 2016)

3.1.1.2 Processo de classificação

3.1.1.2.1 Verificação do período de lactação

O leite humano pode ser classificado em colostro (menos de sete dias após o parto), leite humano de transição (de sete a quatorze dias após o parto) e leite humano maduro (mais de quatorze dias após o parto). (ALMEIDA, 1999) Para o estudo foi utilizado o leite humano maduro devido a sua menor variabilidade de nutrientes em comparação aos leites de transição e colostro.

3.1.1.2.2 Conteúdo energético – crematócrito

Crematócrito é a técnica analítica que permite o cálculo estimado do conteúdo energético do leite humano ordenhado. (BRASIL, 2006)

Foi feita a homogeneização do frasco contendo o leite e posteriormente foi pipetado 1ml de leite para um vidro de penicilina e esses foram dispostos em estante e levado ao banho maria para aquecimento a 40°C durante 15 minutos. Em seguida foram coletados de forma independente, duas alíquotas de 75 µL de cada amostra com auxílio de microcapilares e vedadas com massa. Os capilares foram centrifugados por 15 minutos em centrífuga de micro hematócrito. Após a centrifugação são formadas duas colunas: em uma extremidade fica a coluna de creme e na outra a coluna de soro. Com o auxílio de uma régua foi medido o tamanho da coluna (mm) de creme e da coluna total para inserir os resultados nas fórmulas:

Avaliação do teor de creme:

Coluna de creme (mm) x 100 / coluna total (mm) = % de creme

Avaliação do teor de gordura:

(% creme - 0,59) / 1,46 = % de gordura

Cálculo do conteúdo energético total:

(% de creme x 66,8 + 290) = Kcal/L

Em seguida o leite humano passou por algumas etapas visando à obtenção do concentrado com o liofilizado de leite humano, mas antes parte do leite sem nenhuma manipulação, denominada Leite Humano *Baseline* foi separada para o processo de pasteurização e análise microbiológica e posteriormente para a determinação de lipídios totais e perfil de ácidos graxos.

3.2 Obtenção do Concentrado com o liofilizado de leite humano

3.2.1 Liofilização

Para a liofilização, 50 ml do leite humano foram transferidos para um recipiente de vidro inerte e estéril e congeladas a -18°C por 24 hrs. Após esse período as amostras congeladas foram colocadas na câmara de vácuo do liofilizador de bancada (Liofilizador L108®, LioTop, São Carlos – SP – Brasil).

Após 72 horas, as amostras foram retiradas do liofilizador e mantidas em cadeia de frio para serem reconstituídas com leite humano.

O processo de liofilização promove a desidratação do leite por sublimação. O aumento gradativo da temperatura, com a diminuição da pressão circunvizinha permite que a água congelada presente no leite passe diretamente da fase sólida a gasosa.

3.2.2 Reconstituição

As amostras que foram retiradas do liofilizador foram reconstituídas com 75 ml do Leite Humano *Baseline* (LHB) da própria doadora e deram origem ao Concentrado com o liofilizado de Leite Humano no período imediato (LHCI). Esses concentrados juntamente com o Leite Humano *Baseline* passaram pelo processo de pasteurização e controle de qualidade microbiológico.

Os volumes de liofilização e reconstituição foram decididos através de estudos pilotos que mostraram que essa proporção atingiu valores mais adequados de osmolalidade e valores nutricionais ideais. O valor de osmolalidade encontrado com essa proporção foi próximo aos 450 mOsm/kg, que é o nível de corte recomendado pela Academia Americana de Pediatria. (AAP CON, 1976)

3.3 Pasteurização

O LHB e o LHCI foram pasteurizados a 62,5°C por 30 minutos após o tempo de pré-aquecimento. O processo de pasteurização é descrito a seguir:

O banho-maria foi regulado à temperatura de operação (suficiente para atingir 62,5° no ponto frio) e somente depois de estabilizada a temperatura os frascos (padronizados) contendo o LHB e o LHCI foram postos no banho; O nível de leite no interior da embalagem deve ficar abaixo do nível da água do banho-maria e em função do desprendimento de ar dissolvido no leite humano durante o processo de aquecimento, o rosqueamento das tampas estavam com folga de ¼ de volta (embalagem semifechada);

Assim que a temperatura do leite humano atingiu a marca de 62,5°C (tempo de pré-aquecimento) iniciou-se a marcação do tempo de letalidade térmica (30 minutos); a cada cinco minutos os frascos foram agitados manualmente, sem retirá-los do banho-maria.

Transcorridos os 30 minutos relativos à letalidade térmica, os frascos foram retirados do banho e foi promovido o resfriamento dos mesmos até que o leite humano atingiu uma temperatura igual ou menor a 5°C.

A pasteurização é um tratamento térmico aplicável ao leite humano, que adota como referência a inativação térmica do microrganismo mais termorresistente, a *Coxiella burnetti*. Uma vez observado o binômio temperatura de inativação e tempo de exposição capaz de inativar esse microrganismo, pode-se assegurar que os demais patógenos também estarão termicamente inativados. (BRASIL, 2001)

3.4 Controle de qualidade microbiológico

Para o controle de qualidade microbiológico as amostras de LHB e LHCI que foram pasteurizadas passaram pelo procedimento de detecção de coliformes totais.

Foram inoculadas duas alíquotas de 1ml cada de LHB e LHCI em tubos de 10 ml de caldo bile verde brilhante (50g/L – 5% p/v), com tubos de Durham em seu interior. Após a inoculação e incubação desses tubos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48hrs em estufa bacteriológica, foram analisadas a presença de gás no interior do tubo de Durham, que caracteriza resultado positivo. Se houvessem resultados positivos, por sua vez, essas amostras passariam por uma prova confirmatória, inoculando 0,05 ml de leite em caldo bile verde brilhante (40g/L – 4% p/v) e sendo incubadas pelas mesmas condições do teste inicial. A presença de gás indicando a existência de microrganismos do grupo coliforme confirma que o produto é impróprio para consumo e deve ser descartado. (FIOCRUZ, 2003) (BRASIL, 2001) (NOVAK; ALMEIDA, 2002)

Após essas etapas realizadas Concentrado com o liofilizado de Leite Humano no período imediato foi subdividido em outros dois recipientes para o seu armazenamento no período de 3 (LHC3m) e 6 (LHC6) meses de estocagem, em freezer utilizado para estocagem de leite humano de banco a -18°C , para avaliação da estabilidade nutricional do Concentrado com liofilizado de leite humano. Com todas as amostras foram feitas a análise de lipídios totais (Banco de Leite Humano da Faculdade de Medicina de Ribeirão - USP) e perfil lipídico (Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP), totalizando 200 amostras (50 de cada grupo).

3.5 Análise dos lipídios totais

A quantificação de lipídios totais, bem como dos demais macronutrientes, foi feita pelo Analisador de Leite Humano MIRIS® (Miris, Uppsala, Suécia) após homogeneização com Sonicator MIRIS® (Miris, Uppsala, Suécia), que determinou diretamente o conteúdo nutricional do leite humano a partir de 2ml da amostra.

3.6 Perfil lipídico

Para a análise dos ácidos graxos foi feita a extração de gordura através do método de Bligh e Dyer (BLIGH; DYER, 1959) e a metilação com hidróxido de potássio em metanol (KOH/MeOH) a 0,5 M (reação de derivatização).

Para essa análise foi necessário 0,8 ml de leite colocado em tubos de ensaio de 10 ml com tampa. A essas amostras foram adicionadas 2 ml de clorofórmio e 4 ml de metanol, com posterior agitação de 2 minutos e centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos. Todo o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 10 ml e adicionado mais 2 ml de clorofórmio e 2 ml de água. Novamente agitado por 1 minuto e centrifugado a 3000 rpm por 8 minutos. A fase superior foi desprezada utilizando uma pipeta tipo Pasteur e a fase remanescente foi filtrada utilizando papel de filtro embebido em clorofórmio. O filtrado foi posto em tubos de 10 ml e seguido para a reação de metilação. Todo o solvente foi evaporado em corrente de $N_2(g)$. Depois foi acrescentado 1,5 ml de hexano e 0,5 ml de KOH/MeOH. A solução foi agitada por 1 minuto e centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos. A camada superior foi transferida para um *vial* de 2 ml e evaporada em corrente de $N_2(g)$ até um volume aproximado de 250 μ L que foi injetado no cromatógrafo gasoso.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa utilizando o cromatógrafo gasoso SHIMADZU, GC – 2014 (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany), com coluna capilar de polietileno glicol – Supelcowax 10 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno; 0,25 μ m de espessura do filme; Supelco Inc., Bellefonte, PA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste, com vazão de 1,0 ml/min. O ar sintético foi utilizado para a ionização em chama com detecção a 280°C.

A separação dos ácidos graxos foi feita com um gradiente de temperatura em uma coluna capilar de polietileno glicol. A temperatura inicial da coluna foi de 100 °C, a qual foi mantida por um minuto, logo após, essa temperatura foi acrescida na taxa de 13 °C por minuto a 195°C, mantidos por cinco minutos e, posteriormente, elevada a 240°C, na taxa de 15°C por minutos, onde foi mantida nessa temperatura por 30 minutos. As injeções de 1 μ l de amostras foram realizadas em modo *split*. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C. A identificação dos picos cromatográficos, assim como a determinação da porcentagem dos ácidos graxos presentes nas amostras (Proporção em relação à quantidade total de ácidos graxos identificados) foi feita pela comparação dos tempos de retenção e da área dos picos das amostras com a do padrão externo Supelco 37 Component FAME Mix.

3.7 Análise Estatística

Os dados foram apresentados em valores de média $\pm$ desvio padrão e gráficos de box plot (ANEXO B). Análise de variância (ANOVA, modelo linear geral) para medidas repetidas com teste *post-hoc* de Bonferroni foi o método utilizado para a análise de lipídios totais.

Para a análise do perfil lipídico foi feita análise de variância de medidas repetidas e devido à variabilidade, as variáveis foram consideradas na forma de logaritmo de base exponencial (ln) nas análises. Para as comparações entre os momentos, foram ajustados modelos lineares de efeitos mistos, através do PROC MIXED do software SAS 9.3. Os contrastes ortogonais (comparações múltiplas) foram estimados apenas nos casos em que a hipótese nula (não há diferença entre as médias dos tempos) fosse rejeitada. Em todos os casos o nível de significância foi pré-fixado para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Características das doadoras de leite humano

Ao todo 50 mães participaram do estudo. As características das mães doadoras estão resumidas na Tabela 1. A idade média das mulheres foi de 30,4 anos e idade gestacional foi de 38,43 semanas. O peso e altura média das mães foram de 67,52 kg e 1,63 m. O Índice de Massa Corporal (IMC) médio das doadoras foi de 25,2 kg/ m². Sobre o tipo de parto 60% tiveram parto cesárea e 40% parto normal.

Tabela 1 - Características das mães do estudo

Mães (n=50)	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	30,45	6,05	17	44
Peso (kg)	67,52	11,92	47	95
Altura (m)	1,63	5,89	1,52	1,77
IMC (kg/m ²)	25,2	4,39	18,1	38,1
Idade gestacional (semanas)	38,43	2,27	27	42

4.2 Acidez Dornic e Crematócrito

Nas 50 amostras de leite humano a média e o desvio padrão da Acidez Dornic foi de 4,34°D±1,59 e a média e desvio padrão do crematócrito foi de 602,96±139,86 Kcal/L.

4.3 Controle de qualidade microbiológico

Todas as amostras analisadas tiveram o teste de qualidade microbiológico negativo.

4.4 Lipídios totais

A média, desvio padrão e valores mínimos e máximos da quantidade de lipídios totais nas amostras de LHB, LHCI, LHC3m e LHC6m são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de lipídios totais nas amostras de LHB, LHCI, LHC3m e LHC6m.

Lipídios totais (g/100ml)	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
LHB	2,59	1,08	0,80	5,00
LHCI	4,03	1,44	1,30	7,50
LHC3m	3,68	1,34	1,30	6,80
LHC6m	3,96	1,28	1,50	7,10

LHB: Leite Humano *Baseline*; LHCI: Concentrado com liofilizado de Leite Humano no período imediato; LHC3m: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 3 meses; LHC6m: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 6 meses.

A Figura 2 ilustra esses dados na forma de box plot.

Figura 2 - Box plot da quantidade de lipídios totais.

O LHCI, LHC3m e LHC6m apresentaram aumento dos lipídeos totais se comparado com o LHB. Houve diferença estatística significativa entre o momento inicial (*baseline*) e os demais momentos (concentrados) ($p < 0,05$).

Não houve diferenças na quantidade de lipídios totais entre os concentrados LHCI, LHC3m e LHC6m. A Tabela 3 apresenta esses resultados.

Tabela 3 - Valores comparativos de lipídios totais nos diferentes tempos de análise.

Grupos	Comparações	Diferença	p-valor	IC95%	
				LI	LS
LHB (T1)	T1-T2	-1,44	< 0,01 *	-1,844	-1,028
	T1-T3	-1,09	< 0,01 *	-1,441	-0,743
	T1-T4	-1,10	< 0,01 *	-1,469	-0,735
LHCI (T2)	T2-T1	1,44	< 0,01 *	1,028	1,844
	T2-T3	0,34	0,07	-0,023	0,711
	T2-T4	0,33	0,05	-0,007	0,675
LHC3m (T3)	T3-T1	1,09	< 0,01 *	0,743	1,441
	T3-T2	-0,44	0,07	-0,711	0,023
	T3-T4	-0,01	1,00	-0,111	0,091

	T4-T1	1,10	< 0,01 *	0,735	1,469
LHC6m (T4)	T4-T2	-0,33	0,05	-0,058	0,007
	T4-T3	0,01	1,00	-0,091	0,111

Resultados expressos pela diferença das médias nos diferentes grupos. * Houve diferença estatística. LHB (T1): Leite Humano *Baseline* (tempo 1); LHCI (T2): Concentrado com liofilizado de Leite Humano no período imediato (tempo 2); LHC3m (T3): Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 3 meses (tempo 3); LHC6m: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 6 meses (tempo 4).

4.5 Análise de macronutrientes

Outros macronutrientes foram determinados junto com os resultados dos lipídios totais no Analisador de Leite Humano Miris®. O *Miris Human Milk Analyser* é baseado em tecnologia espectroscopia infravermelha (*infrared transmission spectroscopy*). Com esta tecnologia precisa e acurada, todos os componentes nutricionais são analisados em conjunto. Micronutrientes (não apresentados neste trabalho) foram determinados no Laboratório de Pediatria - Metais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, resultados pertencentes ao *Projeto: Elaboração de um Concentrado com Liofilizado de Leite Humano para Alimentação de Recém-nascidos Pré-termo de Muito Baixo Peso*, como um todo.

A tabela 4 apresenta os resultados desses outros macronutrientes, a título de informação adicional.

Tabela 4 - Macronutrientes analisados pelo Analisador de Leite Humano MIRIS®, além dos lipídios totais.

	LHB	LHCI	LHC3m	LHC6m
Proteína (g/100ml)	0,90 ± 0,48	1,47 ± 0,58	1,39 ± 0,60	1,46 ± 0,54
Carboidrato (g/100ml)	7,08 ± 0,67	9,17 ± 0,68	9,20 ± 0,63	9,18 ± 0,64
Sólidos Totais (g/100ml)	14,29 ± 17,30	14,76 ± 1,71	14,47 ± 1,77	14,53 ± 1,71
Energia (kcal/100ml)	56,30 ± 10,50	79,96 ± 13,74	76,98 ± 13,91	77,30 ± 13,77
Prot. verdadeira (g/100ml)	0,75 ± 0,39	1,20 ± 0,47	1,13 ± 0,49	1,19 ± 0,43
Osmolalidade (mOsm/Kg)	289,48 ± 43,64	452,12 ± 59,79	456,16 ± 56,57	458,14 ± 55,66

Resultados expressos em média ± DP. LHB - Leite Humano *Baseline*; LHCI: Concentrado com liofilizado de Leite Humano no período imediato; LHC3m: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 3 meses; LHC6m: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 6 meses.

As concentrações de micronutrientes no leite humano (Na, K, Ca, Mg, P, Cu, Zn) nos 4 diferentes momentos deverão ser apresentadas em outro trabalho de pós-graduação.

4.6 Perfil Lipídico

A Tabela 5 mostra o perfil de ácidos graxos no Leite Humano *Baseline* e nos Concentrados. Os dados estão em porcentagem (%) em relação ao total de ácidos graxos identificados.

Tabela 5 - Perfil lipídico completo das amostras LHB, LHCI, LHC3m e LHC6m, expressos em porcentagem (%) em relação ao total de ácidos graxos identificados.

Ácidos Graxos	LHB	LHCI	LHC3m	LHC6m	p-valor
C4:0 (Ácido butírico)	0,01 ± 0,01 ^{a,c}	0,01 ± 0,01 ^{a,c}	0,01 ± 0,01 ^{a,d}	< 0,01 ^{b,d}	< 0,01*
C6:0 (Ácido capríco)	0,05 ± 0,05 ^a	0,06 ± 0,03 ^b	0,06 ± 0,03 ^b	0,06 ± 0,03 ^b	< 0,01*
C8:0 (Ácido caprílico)	0,14 ± 0,12 ^a	0,18 ± 0,08 ^b	0,19 ± 0,09 ^b	0,20 ± 0,09 ^b	< 0,01*
C10:0 (Ácido cáprico)	1,43 ± 0,60 ^a	1,64 ± 0,48 ^b	1,73 ± 0,61 ^b	1,72 ± 0,50 ^b	< 0,01*
C11:0 (Ácido undecílico)	0,09 ± 0,18 ^a	0,05 ± 0,02 ^b	0,04 ± 0,02 ^b	0,04 ± 0,03 ^b	< 0,01*
C12:0 (Ácido láurico)	6,11 ± 2,30 ^a	6,91 ± 1,87 ^b	7,10 ± 2,27 ^b	7,00 ± 1,74 ^b	< 0,01*
C13:0 (Ácido tridecanóico)	0,04 ± 0,08	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,16 ± 0,93	0,10
C14:0 (Ácido mirístico)	6,51 ± 2,35 ^a	6,68 ± 2,03 ^a	6,82 ± 1,95 ^b	6,92 ± 1,81 ^b	< 0,01*
C14:1 (Ácido miristoléico)	0,17 ± 0,06 ^{a,c}	0,17 ± 0,06 ^{a,c}	0,18 ± 0,06 ^{b,c}	0,19 ± 0,07 ^{b,d}	< 0,01*
C15:0 (Ácido pentadecanóico)	0,26 ± 0,08 ^{a,d}	0,24 ± 0,07 ^{b,c}	0,25 ± 0,07 ^{a,d}	0,26 ± 0,07 ^{a,d}	< 0,01*
C15:1 (Ácido cis 10-pentadecenóico)	0,07 ± 0,09 ^{a,d}	0,05 ± 0,02 ^{b,c}	0,06 ± 0,02 ^{a,c}	0,07 ± 0,07 ^{a,d}	< 0,01*
C16:0 (Ácido palmítico)	22,30 ± 2,80 ^{a,d}	21,46 ± 2,23 ^{b,c}	21,54 ± 2,09 ^{b,c}	21,95 ± 2,06 ^{a,d}	< 0,01*
C16:1 (Ácido palmitoléico)	1,86 ± 0,59	1,94 ± 0,52	1,93 ± 0,51	1,94 ± 0,51	0,06
C17:0 (Ácido margárico)	0,29 ± 0,06 ^{a,d,f}	0,27 ± 0,05 ^{b,c,e}	0,27 ± 0,05 ^{b,c,e}	0,28 ± 0,06 ^{a,d,f}	< 0,01*
C17:1 (Ácido cis 10-heptadecanóico)	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,49
C18:0 (Ácido esteárico)	6,44 ± 1,43 ^a	6,01 ± 1,16 ^b	5,92 ± 1,12 ^b	6,05 ± 1,07 ^b	< 0,01*
C18:1n9c (Ácido oléico)	30,41 ± 4,36	30,47 ± 3,41	30,55 ± 3,56	29,79 ± 3,28	0,46
C18:2n6c (Ácido linoléico)	19,62 ± 4,11	19,88 ± 3,68	19,49 ± 3,49	19,45 ± 3,40	0,58
C18:3n6 (Ácido γ - linoléico)	0,16 ± 0,07	0,16 ± 0,05	0,15 ± 0,04	0,16 ± 0,06	0,58
C18:3n3 (Ácido α - linolênico)	1,32 ± 0,39	1,37 ± 0,32	1,34 ± 0,32	1,34 ± 0,30	0,14
C20:0 (Ácido araquídico)	0,13 ± 0,07 ^a	0,11 ± 0,03 ^b	0,11 ± 0,03 ^b	0,12 ± 0,03 ^b	< 0,01*
C20:1n9 (Ácido gadoléico)	0,25 ± 0,10	0,23 ± 0,06	0,23 ± 0,06	0,23 ± 0,06	0,37
C20:2 (Ácido 11,14 - eicosadienóico)	0,31 ± 0,10	0,30 ± 0,08	0,30 ± 0,08	0,30 ± 0,08	0,87
C20:3n6 (Ácido dihome - γ linoléico)	0,05 ± 0,09 ^a	0,03 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,04 ^b	0,01*
C21:0 (Ácido heneicosanóico)	0,37 ± 0,11	0,38 ± 0,12	0,37 ± 0,08	0,37 ± 0,10	0,41
C20:3n3 (Ácido eicosatrienóico)	0,50 ± 0,12	0,52 ± 0,11	0,52 ± 0,10	0,52 ± 0,11	0,14
C20:4n6 (Ácido araquidônico)	0,35 ± 0,79 ^{a,d}	0,16 ± 0,08 ^{b,c}	0,13 ± 0,09 ^{b,d}	0,15 ± 0,10 ^{b,c}	< 0,01*
C20:5n3 (Ácido eicosapentaenóico)	0,10 ± 0,06 ^a	0,09 ± 0,03 ^a	0,09 ± 0,03 ^b	0,09 ± 0,04 ^b	< 0,01*
C22:1n9 (Ácido erúico)	0,04 ± 0,05 ^a	0,04 ± 0,02 ^b	0,03 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,02 ^b	< 0,01*
C22:2 (Ácido 13,16 - docosadienóico)	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,14
C24:0 (Ácido lignosérico)	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,12
C24:1n9 (Ácido lignoceroléico)	0,16 ± 0,09 ^a	0,18 ± 0,09 ^a	0,17 ± 0,09 ^a	0,19 ± 0,09 ^b	< 0,01*
C22:6n-3 (Ácido docosahexaenóico)	0,10 ± 0,10 ^a	0,06 ± 0,03 ^b	0,05 ± 0,03 ^b	0,06 ± 0,04 ^b	< 0,01*

Resultados expressos em média ± DP. LHB - Leite Humano *Baseline*; LHCI: Concentrado com liofilizado de Leite Humano no período imediato; LHC3m: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 3 meses; LHC6m: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 6 meses. *Houve diferença significativa entre os grupos. a,b,c,d,e,f: Valores médios na mesma linha com letras divergentes foram significativamente diferentes (p<0,05).

O ANEXO B ilustra esses dados de cada variável na forma de box plot.

O ácido graxo oléico (C18:1n-9) foi o que apresentou maior proporção em relação à quantidade total de ácidos graxos identificados nos 4 grupos com 30,41% no LHB, 30,47% no LHCI, 30,55% no LHC3m e 29,79% no LHC6m, sem diferença estatística entre as médias dos grupos ($p=0,46$). Seguido do ácido palmítico (C16:0) que apresentou uma proporção em relação à quantidade total de ácidos graxos identificados de 22,30% no LHB, 21,46% no LHCI, 21,54% no LHC3m e 21,95% no LHC6m, com diferença estatística entre as médias dos grupos ($p<0,01$).

No grupo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) da classe ômega 6 o ácido de maior proporção em relação à quantidade total de ácidos graxos identificados foi o ácido linoléico (C18:2 ω -6) com 19,62% no LHB, 19,88% no LHCI, 19,49% no LHC3m e 19,45% no LHC6m, sem diferença estatística entre os grupos ($p=0,58$). O principal LC-PUFAs da classe ômega 6 é o ácido araquidônico (C20:4 ω -6) que apresentou uma proporção em relação à quantidade total de ácidos graxos identificados de 0,35% no LHB, 0,16% no LHCI, 0,13% no LHC3m e 0,15% no LHC6m, com diferença estatística entre as médias dos grupos ($p<0,01$).

No grupo de ácidos graxos poli-insaturados da classe ômega 3, o ácido de maior proporção em relação à quantidade total de ácidos graxos identificados foi o ácido α - linolênico (C18:3 ω -3) com 1,32% no LHB, 1,37% no LHCI, 1,34% no LHC3m e 1,34% no LHC6m, sem diferença estatística entre os grupos ($p=0,14$). Os principais LC-PUFAs da classe ômega 3 são o ácido eicosapentaenóico (C20:5 ω -3) e o ácido docosahexaenóico (C22:6 ω -3), que apresentou uma proporção em relação à quantidade total de ácidos graxos identificados de 0,10% no LHB, 0,09% no LHCI, 0,09% no LHC3m e 0,09% no LHC6m, e de 0,10% no LHB, 0,06% no LHCI, 0,05% no LHC3m e 0,06% no LHC6m, respectivamente. Ambos apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos: EPA $p<0,01$ e DHA $p<0,01$.

4.6.1 Ácidos Graxos Saturados (SFAs)

A somatória de ácidos graxos saturados (Σ SFAs) foi de 44,28% no LHB, 44,13% no LHCI, 44,55% no LHC3m e 45,25% no LHC6m, sendo o ácido palmítico (C16:0) o de maior proporção.

Dentre os SFAs 12 tiveram diferenças estatísticas entre os tempos. São eles C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0. A Tabela 6

mostra as diferenças estatísticas na comparação entre cada tempo. A diferença das médias está em log (médias geométricas) devido a grande variabilidade dos resultados.

O ácido butírico (C4:0) foi maior no LHB do que no LHC6m; e foi maior no LHCI do que no LHC3m e LHC6m.

O ácido capróico (C6:0) foi menor no LHB do que no LHCI, LHC3m e LHC6m.

O ácido caprílico (C8:0) foi menor no LHB do que no LHCI, LHC3m e LHC6m.

O ácido cáprico (C10:0) foi menor no LHB do que no LHCI, LHC3m e LHC6m.

O ácido undecílico (C11:0) foi maior no LHB do que no LHCI, LHC3m e LHC6m.

O ácido láurico (C12:0) foi menor no LHB do que no LHCI, LHC3m e LHC6m.

O ácido mirístico (C14:0) foi menor no LHB do que no LHC3m e LHC6m.

O ácido pentadecanóico (C15:0) foi maior no LHB do que no LHCI; e foi menor no LHCI do que no LHC3m e LHC6m.

O ácido palmítico (C16:0) foi maior no LHB do que no LHCI e LHC3m; e foi menor no LHCI do que no LHC6m.

O ácido margárico (C17:0) foi maior no LHB do que no LHCI e LHC3m; foi menor do LHCI do que no LHC6m; e foi menor no LHC3m do que no LHC6m.

O ácido esteárico (C18:0) foi maior no LHB do que no LHCI, LHC3m e LHC6m.

O ácido araquídico (C20:0) foi maior no LHB do que no LHCI, LHC3m e LHC6m.

Tabela 6 - Diferença estatística nos diferentes tempos dos ácidos graxos saturados (SFAs)

SFAs	Comparações	Diferença (log)	p-valor	IC95%	
				LI	LS
C4:0	T1 - T2	-0,273	0,11	-0,606	0,061
	T1 - T3	0,208	0,22	-0,126	0,542
	T1 - T4	0,362	0,03*	0,028	0,695
	T2 - T3	0,480	< 0,01*	0,147	0,814
	T2 - T4	0,634	< 0,01*	0,301	0,968
	T3 - T4	0,154	0,36	-0,180	0,488
C6:0	T1 - T2	-0,442	< 0,01*	-0,602	-0,282
	T1 - T3	-0,444	< 0,01*	-0,604	-0,284
	T1 - T4	-0,544	< 0,01*	-0,704	-0,384
	T2 - T3	-0,002	0,98	-0,162	0,158
	T2 - T4	-0,102	0,21	-0,262	0,058
	T3 - T4	-0,101	0,22	-0,261	0,060
C8:0	T1 - T2	-0,447	< 0,01*	-0,606	-0,288
	T1 - T3	-0,498	< 0,01*	-0,657	-0,339
	T1 - T4	-0,549	< 0,01*	-0,708	-0,390
	T2 - T3	-0,051	0,53	-0,210	0,108
	T2 - T4	-0,102	0,21	-0,261	0,057

	T3 - T4	-0,051	0,53	-0,210	0,108
C10:0	T1 - T2	-0,177	< 0,01*	-0,262	-0,091
	T1 - T3	-0,220	< 0,01*	-0,305	-0,135
	T1 - T4	-0,221	< 0,01*	-0,306	-0,136
	T2 - T3	-0,043	0,32	-0,128	0,042
	T2 - T4	-0,045	0,30	-0,130	0,041
	T3 - T4	-0,001	0,98	-0,086	0,084
C11:0	T1 - T2	0,339	< 0,01*	0,126	0,553
	T1 - T3	0,539	< 0,01*	0,325	0,753
	T1 - T4	0,468	< 0,01*	0,254	0,682
	T2 - T3	0,200	0,07	-0,014	0,414
	T2 - T4	0,129	0,24	-0,085	0,342
	T3 - T4	-0,071	0,51	-0,285	0,143
C12:0	T1 - T2	-0,148	< 0,01*	-0,215	-0,081
	T1 - T3	-0,168	< 0,01*	-0,235	-0,101
	T1 - T4	-0,166	< 0,01*	-0,233	-0,100
	T2 - T3	-0,020	0,55	-0,087	0,046
	T2 - T4	-0,019	0,59	-0,085	0,048
	T3 - T4	0,002	0,96	-0,065	0,069
C14:0	T1 - T2	-0,038	0,12	-0,086	0,010
	T1 - T3	-0,066	< 0,01*	-0,114	-0,018
	T1 - T4	-0,082	< 0,01*	-0,131	-0,034
	T2 - T3	-0,028	0,25	-0,077	0,020
	T2 - T4	-0,044	0,07	-0,093	0,004
	T3 - T4	-0,016	0,51	-0,064	0,032
C15:0	T1 - T2	0,083	< 0,01*	0,027	0,139
	T1 - T3	0,021	0,46	-0,035	0,077
	T1 - T4	-0,023	0,41	-0,079	0,033
	T2 - T3	-0,062	0,03*	-0,118	-0,006
	T2 - T4	-0,106	< 0,01*	-0,162	-0,050
	T3 - T4	-0,044	0,12	-0,100	0,012
C16:0	T1 - T2	0,036	< 0,01*	0,014	0,058
	T1 - T3	0,032	< 0,01*	0,010	0,054
	T1 - T4	0,013	0,26	-0,009	0,035
	T2 - T3	-0,004	0,70	-0,026	0,018
	T2 - T4	-0,023	0,04*	-0,046	-0,001
	T3 - T4	-0,019	0,09	-0,041	0,003
C17:0	T1 - T2	0,070	< 0,01*	0,020	0,120
	T1 - T3	0,068	< 0,01*	0,018	0,119
	T1 - T4	0,015	0,57	-0,036	0,065
	T2 - T3	-0,002	0,94	-0,052	0,048
	T2 - T4	-0,056	0,03*	-0,106	-0,005
	T3 - T4	-0,054	0,04*	-0,104	-0,004

C18:0	T1 - T2	0,064	< 0,01*	0,029	0,098
	T1 - T3	0,077	< 0,01*	0,043	0,112
	T1 - T4	0,053	< 0,01*	0,019	0,088
	T2 - T3	0,014	0,44	-0,021	0,048
	T2 - T4	-0,010	0,56	-0,045	0,024
	T3 - T4	-0,024	0,18	-0,059	0,011
C20:0	T1 - T2	0,137	< 0,01*	0,062	0,212
	T1 - T3	0,136	< 0,01*	0,061	0,211
	T1 - T4	0,098	< 0,01*	0,023	0,173
	T2 - T3	-0,001	0,98	-0,076	0,074
	T2 - T4	-0,039	0,31	-0,114	0,036
	T3 - T4	-0,038	0,32	-0,113	0,037

Resultados expressos pela diferença das médias geométricas nos diferentes grupos. *Houve diferença estatística. T1: Leite Humano *Baseline* (tempo 1); T2: Concentrado com liofilizado de Leite Humano no período imediato (tempo 2); T3: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 3 meses (tempo 3); T4: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 6 meses (tempo 4).

4.6.2 Ácidos Graxos Monoinsaturados (MUFAs)

A somatória de ácidos graxos monoinsaturados (Σ MUFAs) foi de 33,15% no LHB, 33,24% no LHCI, 33,32% no LHC3m e 32,62% no LHC6m. Sendo o ácido oleico (C18:1n-9) o de maior proporção.

Dentre os MFAs 4 tiveram diferenças estatísticas entre os tempos. São eles C14:1, C15:1, C22:1n-9 e C24:1n-9. A Tabela 7 mostra as diferenças estatísticas na comparação entre os diferentes tempos dos MUFAs.

O ácido miristoléico (C14:1) foi menor no LHB do que no LHC3m e LHCC6m; e foi menor no LHCI do que no LHC6m.

O ácido cis 10-pentadecenóico (C15:1) foi maior no LHB do que no LHCI; e foi menor no LHCI do que no LHC6m.

O ácido erúico (C22:1 n-9) foi maior no LHB do que no LHCI, LHC3m e LHC6m.

O ácido lignoceroléico (C24:1 n-9) foi menor no LHB do que no LHC6m.

Tabela 7 - Diferença estatística nos diferentes tempos dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs)

MUFAs	Comparações	Diferença (log)	p-valor	IC95%	
				LI	LS
C14:1	T1 - T2	-0,032	0,28	-0,090	0,027
	T1 - T3	-0,084	< 0,01*	-0,142	-0,025
	T1 - T4	-0,125	< 0,01*	-0,183	-0,066
	T2 - T3	-0,052	0,08	-0,110	0,007
	T2 - T4	-0,093	< 0,01*	-0,152	-0,034
	T3 - T4				

	T3 - T4	-0,041	0,17	-0,100	0,017
C15:1	T1 - T2	0,199	< 0,01*	0,078	0,320
	T1 - T3	0,096	0,12	-0,024	0,217
	T1 - T4	0,024	0,70	-0,097	0,144
	T2 - T3	-0,103	0,09	-0,223	0,018
	T2 - T4	-0,175	< 0,01*	-0,296	-0,055
	T3 - T4	-0,073	0,24	-0,193	0,048
C22:1n9	T1 - T2	0,127	0,03*	0,009	0,244
	T1 - T3	0,188	< 0,01*	0,070	0,305
	T1 - T4	0,174	< 0,01*	0,057	0,291
	T2 - T3	0,061	0,30	-0,056	0,179
	T2 - T4	0,048	0,43	-0,070	0,165
	T3 - T4	-0,014	0,82	-0,131	0,104
C24:1n9	T1 - T2	-0,085	0,08	-0,180	0,010
	T1 - T3	-0,083	0,09	-0,178	0,012
	T1 - T4	-0,166	< 0,01*	-0,261	-0,071
	T2 - T3	0,002	0,96	-0,092	0,097
	T2 - T4	-0,081	0,10	-0,176	0,014
	T3 - T4	-0,083	0,09	-0,178	0,012

Resultados expressos pela diferença das médias geométricas nos diferentes grupos. *Houve diferença estatística. T1: Leite Humano *Baseline* (tempo 1); T2: Concentrado com liofilizado de Leite Humano no período imediato (tempo 2); T3: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 3 meses (tempo 3); T4: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 6 meses (tempo 4).

4.6.3 Ácidos Graxos Poli-insaturados (PUFAs)

A somatória de ácidos graxos poli-insaturados (Σ PUFAs) da classe ômega 6 foi de 20,18% no LHB, 20,22% no LHCI, 19,80% no LHC3m e 19,79% no LHC6m. Sendo o de maior proporção o ácido linoléico (C18:2 n-6).

A somatória de ácidos graxos poli-insaturados (Σ PUFAs) da classe ômega 3 foi de 2,36% no LHB, 2,38% no LHCI, 2,32% no LHC3m e 2,34% no LHC6m. Sendo o de maior proporção o ácido α -linolênico (C18:3 n-3). A Tabela 8 mostra as diferenças estatísticas na comparação entre os diferentes tempos dos PUFAs.

Dentre os PUFAs 4 tiveram diferenças estatísticas entre os tempos. São eles C20:3 n-6, C20:4n-6 (ômega 6); C20:5n-3 e C22:6n-3 (ômega 3).

O ácido dihomo - γ linoléico (C20:3n6) foi maior no LHB do que no LHCI, LHC3m e LHC6m.

O ácido araquidônico (C20:4n6) foi maior no LHB do que no LHCI, LHC3m e LHC6m; e foi maior no LHCI do que no LHC3m.

O ácido eicosapentaenóico (C20:5n-3) foi maior no LHB do que no LHC3m e LHC6m.

O ácido docosahexaenóico (C22:6n-3) foi maior no LHB do que no LHCI, LHC3m e LHC6m.

Tabela 8 - Diferença estatística nos diferentes tempos dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs)

PUFAs	Comparações	Diferença (log)	p-valor	IC95%	
				LI	LS
C20:3n6	T1 - T2	0,272	< 0,01*	0,078	0,467
	T1 - T3	0,291	< 0,01*	0,096	0,485
	T1 - T4	0,258	< 0,01*	0,064	0,453
	T2 - T3	0,019	0,85	-0,176	0,213
	T2 - T4	-0,014	0,89	-0,209	0,181
	T3 - T4	-0,033	0,74	-0,227	0,162
C20:4n6 (ARA)	T1 - T2	0,423	< 0,01*	0,194	0,652
	T1 - T3	0,661	< 0,01*	0,432	0,890
	T1 - T4	0,493	< 0,01*	0,264	0,722
	T2 - T3	0,238	0,04*	0,009	0,467
	T2 - T4	0,070	0,54	-0,158	0,299
	T3 - T4	-0,168	0,15	-0,397	0,061
C20:5n3 (EPA)	T1 - T2	0,064	0,11	-0,014	0,142
	T1 - T3	0,112	< 0,01*	0,035	0,190
	T1 - T4	0,117	< 0,01*	0,039	0,194
	T2 - T3	0,048	0,22	-0,029	0,126
	T2 - T4	0,053	0,18	-0,025	0,130
	T3 - T4	0,004	0,91	-0,073	0,082
C22:6n3 (DHA)	T1 - T2	0,418	< 0,01*	0,188	0,648
	T1 - T3	0,634	< 0,01*	0,404	0,864
	T1 - T4	0,477	< 0,01*	0,247	0,707
	T2 - T3	0,216	0,07	-0,014	0,447
	T2 - T4	0,059	0,61	-0,171	0,289
	T3 - T4	-0,157	0,18	-0,387	0,073

Resultados expressos pela diferença das médias geométricas nos diferentes grupos. *Houve diferença estatística. T1: Leite Humano *Baseline* (tempo 1); T2: Concentrado com liofilizado de Leite Humano no período imediato (tempo 2); T3: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 3 meses (tempo 3); T4: Concentrado com liofilizado de Leite Humano com 6 meses (tempo 4).

A somatória de ácidos graxos dividido por classes do ponto de vista estrutural se encontra na Tabela 9.

Tabela 9 - Resumo da composição de ácidos graxos por classe estrutural

Σ	LHB	LHCI	LHC3m	LHC6m	p-valor
SFA	44,28 $\pm$ 5,15	44,13 $\pm$ 4,46	44,55 $\pm$ 4,69	45,25 $\pm$ 4,31	0,12

MUFA	33,15 ± 4,50	33,24 ± 3,65	33,32 ± 3,82	32,62 ± 3,51	0,45
PUFA ω-6	20,18 ± 3,99	20,22 ± 3,67	19,80 ± 3,47	19,79 ± 3,36	0,32
PUFA ω-3	2,36 ± 0,43	2,38 ± 0,34	2,32 ± 0,35	2,34 ± 0,36	0,53

Resultados expressos em média (% em relação ao total de ácidos graxos identificados) ± Desvio Padrão. SFA: Ácidos graxos saturados; MUFA: Ácidos graxos monoinsaturados; PUFA ω-6: Ácidos graxos poliinsaturados da classe ômega 6; PUFA ω-3: Ácidos graxos poliinsaturados da classe ômega 3.

5. DISCUSSÃO

Apesar de o leite materno ser a melhor opção para a alimentação dos recém-nascidos prematuros, nem sempre o teor de nutrientes deste leite é suficiente para atender a necessidade dos RNPT. A alta variação nutricional existente no leite de cada mãe também desafia a fortificação padrão já conhecida com as fórmulas à base de proteína heteróloga, que podem aumentar a ocorrência de intolerância alimentar e enterocolite necrotizante. (ROCHOW et al., 2015) (DONOVAN et al., 2017)

Há uma crescente tendência na análise *bed side* do leite humano nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatais, apesar de ser uma tecnologia de alto custo. São utilizados analisadores de leite humano por infravermelho que fornecem uma análise rápida do leite materno para conhecer o seu conteúdo de macronutrientes e adaptar essa fortificação que pode ser benéfica para o recém-nascido. Entretanto, por ser uma técnica recente os profissionais devem ser cautelosos e criteriosos quanto ao uso desses equipamentos, que devem ser calibrados e validados e passar por uma adequada preparação de amostra. (ROCHOW et al., 2013) (FUSCH et al., 2015) (FUSCH et al., 2017)

Pesquisas recentes se concentram em novas estratégias de fortificação do leite humano para otimizar a ingestão de macro e micronutrientes essenciais melhorando as taxas de crescimento e desenvolvimento dos RNPT. (ROCHOW et al., 2015) Assim surgiu a suplementação do leite humano com o próprio leite humano liofilizado com o intuito de ofertar uma maior concentração de nutrientes mantendo a qualidade dos nutrientes presentes no leite humano.

No presente estudo, a quantificação dos lipídios totais mostrou, como esperado, a concentração desses nutrientes no Concentrado com liofilizado de leite humano (LHCI) em relação ao Leite Humano *Baseline* (LHB), indicando um maior aporte de energia que poderia ser disponibilizado para os recém-nascidos pré-termo.

A análise do perfil de ácidos graxos foi capaz de mostrar quais são os ácidos graxos presentes no leite humano e sua proporção relativa em relação ao total de ácidos graxos identificados. Para o melhor de nosso conhecimento, a análise do perfil de ácidos graxos das amostras concentradas com liofilizado de leite humano é inédita. Alguns estudos no país como o realizado na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, por Grance et al, 2015, produziram um aditivo homólogo com retirada de parte da lactose por precipitação e foram dosados macronutrientes e eletrólitos, mas não o perfil de ácidos graxos. (GRANCE et al., 2015)

A quantidade de lipídios encontrados no LHB e LHCI foram de 2,59g/100ml e 4,03g/100ml, respectivamente. Os valores obtidos foram maiores do que os encontrados no trabalho de Grance et al, 2015. No leite humano sem a adição do aditivo homólogo a concentração foi de 1,49g/100ml e de 2,91g/100ml com a adição do aditivo homólogo. (GRANCE et al., 2015)

Em 2012, Thomaz *et al* fez um estudo de comparação entre o leite humano com aditivo homólogo (líquido e liofilizado) e um suplemento comercial (FM85® - Nestlé) onde os lipídios e outros macronutrientes/eletrolitos foram dosados. Os resultados obtidos foram 3,75g/100ml para ambos, leite humano mais aditivo homólogo líquido e liofilizado e 3,73g/100ml para o leite humano mais FM85® - Nestlé, sem diferença estatística para esse nutriente. (THOMAZ et al, 2012)

de Halleux e Rigo analisaram o leite humano fortificado com triglicerídeos de cadeia média (MCTs, *Liquigen Danone Nederland*) e encontraram um resultado de 4,20g/100ml de lipídios e ainda um outro grupo de leite humano fortificado com os MCTs mais o fortificante de leite humano Enfamil (*Mead Johnson*) e encontraram um valor de 5,09g/100ml de lipídios. (de HALLEUX; RIGO, 2013)

McLeod et al analisou o leite humano fortificado com um suplemento energético específico (*Duocal; SHS International Limited*) e encontrou um resultado de 4,3g/100ml de lipídios. (MCLEOD et al., 2016)

No presente trabalho também foi analisado a quantidade de lipídios nos Concentrados com liofilizado de Leite Humano no período pós-estocagem por 3 e 6 meses, para avaliar a estabilidade nutricional dos Concentrados. Em relação aos lipídios os valores encontrados foram de 3,68g/100ml para o LHC3m e 3,96g/100ml para o LHC6m, sem diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). A diferença estatística do LHCI com os concentrados estocados com 3 ($p=0,07$) e 6 meses ($p=0,05$) também não foi significativa. (Tabela 3)

O SFA encontrado de maior proporção é o ácido palmítico (C16:0), que apresenta um papel bastante importante para o organismo humano, pois é um dos ácidos graxos saturados presente na dieta e sintetizado endogenamente. Ainda que frequentemente seja considerado como causador de efeitos adversos em doenças degenerativas de adultos, o ácido palmítico é considerado um componente essencial de membranas, lipídios de transporte e secretórios, com papéis cruciais em palmitoilação de proteínas e moléculas de sinalização celular. (BAR-YOSEPH et al., 2013) (GONZÁLEZ; VISENTIN, 2016) (HAVLICEKOVA et al., 2016)

Os resultados encontrados no leite humano maduro (LHB) estão dentro da faixa descrita pela literatura. Os resultados encontrados no trabalho foram 44,30% de SFAs, 22,30%

de ácido palmítico, 20,20% de PUFA ω -6 e 2,40% de PUFA ω -3. Delplanque et al, 2015 relata que o leite humano maduro contém tipicamente de 34 a 47% de SFA especialmente o ácido palmítico (C16:0), que se encontra entre 17 e 25% do montante total, cerca de 12 a 26% de PUFA ω -6 e entre 0,8 e 3,6% de PUFA ω -3. A proporção de ácidos graxos saturados no LHC6m foi um pouco mais alta do que nos outros tempos, mas ainda assim está dentro dos valores considerados normais. (DELPLANQUE et al, 2015)

A identificação dos LC-PUFAs deixa claro que existe a sua presença no leite humano e ressalta a importância da oferta desses lipídios para o recém-nascido, já que o cérebro é rico especialmente em LC-PUFAs ômega 3 e estes desempenham papel fundamental no crescimento neuronal, processos de mielinização e formação da árvore dendrítica, transdução de sinais e excitabilidade das membranas neurais, e na expressão de genes que regulam a diferenciação celular e o seu crescimento. (UAUY; DANGOUR, 2006)

A estrutura lipídica presente no leite materno pode ser considerada única. (GALLIER et al., 2015) E outro componente que reforça esta condição é a estrutura dos triglicerídeos. (INNIS, 2016) (HAVLICEKOVA et al., 2016) Os LC-PUFAs no leite materno encontram-se ligados tanto aos triglicerídeos (80-90%) quanto os fosfolipídios (10-20%). (HAGGARTY, 2004) Aproximadamente 110 mg/dia de DHA são transferidos diariamente pelo leite materno, sendo cerca de 20% desse DHA na forma de fosfolipídios, que são melhor absorvidos e incorporados pelo recém-nascido (KOLETZKO et al, 2011).

O DHA desempenha papéis vitais na estrutura e na função da retina e do cérebro tendo papel particularmente importante na mielinização e formação de sinapses cerebrais, durante a vida fetal e na infância. (CALDER, 2016)

O ARA é um componente-chave das membranas celulares e é um dos ácidos graxos mais abundantes no cérebro, ajudando a manter a fluidez da membrana celular do hipocampo, a proteger de estresse oxidativo e ativa uma proteína (Syntaxina-3 STX-3) envolvida no crescimento e reparação de neurônios. (WANG et al., 2006) (DARIOS; DAVLETOV, 2006) (FUKAYA et al., 2007)

A concentração de LC-PUFAs encontrada neste estudo é considerada baixa, mas como revelam alguns outros estudos, as mulheres brasileiras possuem estado nutricional deficiente em DHA, consequência direta da dieta pobre em peixes e algas e elevado consumo de óleos vegetais. (GIBSON; MUHLHAUSLER; MAKRIDES, 2011) (NISHIMURA et al., 2013)

A ingestão dietética de alimentos de origem marinha é extremamente variável e explica a larga faixa de variação do DHA no leite humano. Alguns trabalhos indicam que a concentração de DHA no leite materno está entre 0,1 e 1,0% do total de ácidos graxos,

embora a concentração média esteja em cerca de 0,33%. (KUIPERS et al., 2005) (YUHAS et al., 2006) (KOLETZKO et al., 2011) (CARLSON et al., 2013)

A população que vive em regiões próximas ao litoral ou lagos pode ter maiores concentrações de DHA devido à alimentação mais farta de peixes ricos em LC-PUFAs, como mostra o estudo que encontrou maiores concentrações de DHA e ARA no leite materno das mulheres que moram próximo ao lago Malawi (República do Malawi, África Oriental), em comparação com valores mundiais normais. Foram encontrados 0,73% de DHA e 0,69% de ARA no leite maduro das mulheres locais. (YAKES JIMENEZ et al., 2015)

O valor de DHA encontrado no LHB (0,10%) foi menor do que o valor relatado em estudos conduzidos em outros lugares do mundo como em Portugal com 0,43% (RIBEIRO et al., 2008), na Alemanha com 0,35% (MASS et al., 2017), na Itália com 0,26% (GROTE et al., 2016), na Hungria com 0,23% (SZABÓ et al., 2010), Taiwan com 0,98% (HUANG et al., 2013), Israel e Países Baixos com 0,17% (SAPHIER et al., 2013) (de van ELTEN et al., 2015), China com 0,30% (GIUFFRIDA et al., 2016), Coreia do Sul com 0,67% (KIM et al., 2017), Espanha com 0,21%. (BARREIRO et al., 2018) E no Brasil, um estudo feito no Rio de Janeiro mostra um teor de 0,17% em lactentes adolescentes. (DE SOUZA SANTOS DA COSTA et al., 2016) Em 2013, Nishimura et al., avaliaram a composição de ácidos graxos do leite humano maduro de mulheres residentes em Ribeirão Preto/São Paulo (área distante da costa litorânea brasileira) e verificou-se que o teor de DHA encontrado no leite humano foi um dos menores já verificados no mundo (0,09%). (NISHIMURA et al., 2013) Reforçando que esses dados são de leite humano *baseline*.

Quando olhamos cada ácido graxo separadamente, houve uma diminuição nas proporções relativas durante os diferentes tempos, como foi o caso do teor de ARA, principal LCPUFA da classe ômega 6 que no LHB foi de 0,35%, e decaiu nos concentrados, LHCI 0,16%, LHC3m 0,13% e LHC6m 0,15%. O teor dos principais ácidos graxos da classe ômega 3, EPA e DHA também sofreram modificações. O teor do EPA foi de 0,10% no LHB para 0,09% nos demais concentrados, com diferença estatística nos períodos de armazenamento de 3 e 6 meses em relação ao LHB. O teor de DHA foi de 0,10% no LHB e decaiu nos concentrados, LHCI 0,06%, LHC3m 0,05% e LHC6m 0,06%. Tais resultados sugerem que houve um processo de oxidação especificamente desses ácidos graxos. Contudo na somatória dos PUFA ômega 6 e ômega 3 não houveram diferenças estatísticas entre os diferentes tempos, ($p=0,32$) e ($p=0,53$), respectivamente. (Tabela 5) Além disso, mesmo com essa queda específica, o teor lipídico aumentou com a adição do liofilizado, (confirmado pelo aumento

dos lipídios totais nos concentrados), assim garantindo uma maior oferta de lipídios para o RNMBP atingindo melhor suas necessidades energéticas.

No estudo viu-se que a manipulação e estocagem do leite humano *baseline* e seus concentrados trouxeram modificações específicas em alguns ácidos graxos. No entanto, quando analisados pela somatória de ácidos graxos por suas classes estruturais não apresentam diferenças além de ter sido possível manter os produtos livre de contaminação, tornando-os viáveis e seguros para consumo.

Em geral, a pasteurização do leite humano doado é eficaz na eliminação do risco de transmissão de agentes infecciosos, mas afeta seus componentes nutricionais e imunológicos, apesar de ser difícil quantificar o nível de degradação. (WIGHT, 2001) (PEILA et al., 2016) Um estudo feito em 2011 por Vieira et al., encontrou uma redução de 5,5% nas concentrações de lipídios no leite humano devido à pasteurização. (VIEIRA et al., 2011). Já outro estudo não apresentou diferença significativa após o processo de pasteurização. (ROMEU-NADAL et al., 2008).

Apesar da controvérsia, quando não é possível dar o leite da própria mãe ao bebê, o leite humano de banco é a melhor opção, apesar da pasteurização. Os dados obtidos pela prática clínica deixam claro que muitas propriedades do leite humano permanecem após a pasteurização e ainda possui vantagens em relação ao uso de fórmulas. Com tudo, novas tecnologias estão sendo estudadas como possíveis alternativas para substituição da pasteurização térmica, como o processamento de alta pressão, que é aplicado em outros alimentos preservando componentes bioativos e nutricionais. (BERTINO et al., 2013) (PEILA et al., 2016) (SOUSA et al., 2016)

A liofilização também é um processo que pode aumentar a vida útil de alguns alimentos evitando o crescimento microbiano e retardando a oxidação de ácidos graxos. No caso do leite humano também preservando melhor suas características nutricionais e componentes imunológicos sem deterioração oxidativa adicional em comparação com o simples congelamento que é o método comumente utilizado para preservar o leite humano. (SHOFIAN et al., 2011) (LOZANO et al., 2014) (CORTEZ; SORIA, 2016)

Lozano et al analisou a composição de ácidos graxos e a capacidade antioxidante de amostras de leite humano liofilizado em diferentes tempos até 3 meses em temperaturas a 4°C e 40°C e mostrou que não houve diferenças estatísticas significativas no perfil de ácidos graxos nas duas temperaturas de armazenamento, inclusive para o ARA e DHA. E a capacidade antioxidante permaneceu praticamente constante nas amostras armazenadas a 4°C, havendo perda somente nas amostras armazenadas a 40°C após 5 dias de armazenamento.

O estudo concluiu que a estabilidade após o armazenamento de leite humano liofilizado foi maior do que o relatado para o leite congelado ou fresco. (LOZANO et al., 2014)

No estudo de Cortez e Soria amostras de leite humano foram estudadas em três tratamentos diferentes: congelamento e conservação por 6 meses a -80°C, liofilização e conservação por 6 meses a 4°C e liofilização e conservação por 6 meses a -80°C. Posteriormente macronutrientes, polifenóis e marcadores de oxidação foram analisados. Em conclusão, observou-se uma adequada conservação em todas as variáveis analisadas pelo processo de liofilização. A liofilização pode melhorar o funcionamento dos Bancos de Leite Humano, protegendo propriedades nutricionais e integridade oxidativa através de um tratamento de fácil manutenção. (CORTEZ; SORIA, 2016)

No presente estudo foram feitas análises piloto para analisar a ocorrência de peroxidação lipídica durante estocagem e a capacidade antioxidante das amostras, mas esses estudos não chegaram a uma conclusão definitiva. Os resultados foram de difícil interpretação já que diversos fatores contribuem para impedir a peroxidação lipídica do leite humano, como a presença de compostos antioxidantes (ex.: vitaminas lipossolúveis e enzimas antioxidantes), que não foram possíveis de serem medidas nesse estudo. (HAVEMOSE et al., 2004) (ELISIA; KITTS, 2011). Devido a variabilidade destes resultados optamos pela não inclusão dos mesmos no presente trabalho, entretanto usamos um método indireto para verificarmos a peroxidação lipídica através do índice de peroxibilidade (IP) descrito por Pamplona et al em 1998 que é calculado com base no grau de insaturação dos ácidos graxos. A fórmula utilizada para o cálculo é descrita a seguir: $IP = (\% \text{ monoenólicos} \times 0,025) + (\% \text{ dienólicos} \times 1) + (\% \text{ trienólicos} \times 2) + (\% \text{ tetraenólicos} \times 4) + (\% \text{ pentaenólicos} \times 6) + (\% \text{ hexaenólicos} \times 8)$. (PAMPLONA, REQUENA et al., 1998) Os valores do índice de peroxibilidade calculados para as amostras LHB, LHCI, LHC3m e LHC6m, (respectivamente 26,9, 26,8, 26,2 e 26,3) indicam uma sutil diminuição nas proporções de insaturações nos diferentes tempos. Essa pequena diferença entre os índices de peroxibilidade pode estar associada à provável oxidação dos ARA, EPA e DHA, mas não indica um processo oxidativo relevante.

O leite humano é sabidamente conhecido por ser altamente nutritivo. No entanto as pesquisas científicas revelam uma diminuição acentuada não somente nos lipídios, mas em outros nutrientes tão importantes quanto, como vitaminas e micronutrientes. Em estudos feitos em alguns países desenvolvidos há uma deficiência em vitaminas D e K, iodo e ferro. Em países com menos recursos constatou-se déficits também em vitamina A, B12, B1 e zinco. As deficiências nutricionais existentes na gravidez serão vistas no perfil nutricional do

leite materno, ou seja, serão transferidas através da amamentação, já que a mãe em lactação não poderá passar para o bebê o nutriente que ela não possui. (ERICK, 2018)

Apesar de atualmente termos deficiências de nutrientes no leite materno, como demonstrado em alguns estudos, ele é a melhor opção que temos para a alimentação dos recém-nascidos pré-termo. A tentativa de adquirir um aditivo de origem totalmente homóloga com esses leites também é satisfatória, pois podem atender as necessidades dos RNPT mesmo com limitações de certos nutrientes, principalmente se auxiliar na diminuição dos desfechos como enterocolite necrosante, vômitos, sepse, entre outros. Até mesmo as pequenas diferenças encontradas nos LC-PUFAs do presente estudo, não diminuem a importância do concentrado com liofilizado de leite humano já que esse mantém nutrientes essenciais e de qualidade encontrados somente no leite materno.

Ao fim desse estudo tivemos como limitação a não aplicação de um questionário que avaliasse a alimentação das mulheres no período pré-gestacional, na gestação e pós-gestacional, que seria informações adicionais para o nosso estudo.

6. CONCLUSÕES

A produção do concentrado com leite humano liofilizado traz grandes benefícios para os recém-nascidos, por ofertarem nutrientes de alta qualidade e preservação dos nutrientes essenciais presentes apenas no leite materno.

Apesar das pequenas diferenças encontradas no perfil lipídico é um alimento que pode vir a atender as necessidades do recém-nascido, já que houve aumento dos lipídios totais e de outros macro e micronutrientes. O concentrado com o liofilizado de leite humano possui uma boa estabilidade nutricional sem mudanças bruscas no perfil de ácidos graxos no armazenamento por até 6 meses.

Estudos clínicos ainda precisam ser feitos para avaliar o desempenho do concentrado como alimentação dos recém-nascidos de muito baixo peso bem como a sua segurança e tolerabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS SA, SCHANLER RJ, LEE ML, RECHTMAN DJ. Greater mortality and morbidity in extremely preterm infants fed a diet containing cow milk protein products. *Breastfeed Med.* 2014;9:281-5.

AGOSTONI C, BUONOCORE G, CARNIELLI VP, et al. Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;50(1):85-91.

ALMEIDA JAG. Amamentação: um híbrido natureza-cultura. Rio de Janeiro: Fiocruz. 1999.

ALMEIDA JAG, NOVAK FR, SANDOVAL MH. Recomendaciones técnicas para los bancos de leche humana II: control de calidad. *Arch Venez Pueric Pediatr.* 1998;61(1):12-15.

ALSHWEKI, et al. Effects of different arachidonic acid supplementation on psychomotor development in very preterm infants; a randomized controlled trial. *Nut J.* 2015;14:101.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS AND COMMITTEE ON NUTRITION (AAP CON). Commentary on breast-feeding and infant formulas included proposed standard formulas. *Pediatrics.* 1976; 57: 278-85.

ANDREAS NJ, KAMPMANN B, MEHRING LE-DOARE K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev.* 2015; 91(11):629-35.

BARREIRO R, REGAL P, LÓPEZ-RACAMONDE O, CEPEDA A, GENTE CA. Comparison of the fatty acid profile of Spanish infant formulas and Galician women breast milk. *J Physiol Biochem.* 2018; 74(1):127-138.

BAR-YOSEPH F, et al. Review of sn-2 palmitate oil implications for infant health. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013;89(4):139-43.

BELKIND-GERSON J, et al. Fatty Acids and Neurodevelopment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47:S7-S9.

BERTINO E, GIULIANI F, BARICCO M, DI NICOLA P, PEILA C, VASSIA C, CHIALE F, PIRRA A, CRESI F, MARTANO C, COSCIA A. Benefits of donor milk in the feeding of preterm infants. *Early Hum Dev.* 2013;89(Suppl 2):S3-6.

BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37:911-7.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da União. Brasília. DF. 2006

BRASIL. Ministério da Saúde. Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano. 4.ed. Brasília. 2001.p. 48. (Série A. Normas e Manuais Técnicos, n. 117).

BRENNA JT. Animal Studies of the Functional Consequences of Suboptimal Polyunsaturated

Fatty Acids Status During Pregnancy, Lactation and Early Postnatal Life. *Mat Child Nutr.* 2011;7(2):59-79.

CALDER PC. Docosahexaenoic acid. *Ann Nutr Metab.* 2016; 69(1):8-21.

CAMELO JR JS, MARTINEZ FE. Nutritional dilemmas in extremely low birth weight infants and their effects on childhood, adolescence and adulthood. *J pediatr (Rio J).* 2005;81(1):33-42.

CARLSON SJ, et al. The Role of ω -3 Fatty Acid DHA in the Human Life Cycle. *J Parent Enter Nutr.* 2013;37(1):15-22.

CARVER J. Advances in nutritional modifications of infant formulas. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1550S-4S.

CHATTERTON DEW, RASMUSSEN JT, HEEGAARD CW, SORENSEN ES, PETERSEN, TE. In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Research on biological functions. *Trends food sci technol.* 2004;15:373-383.

CLEMENS RA, HERNELL O, MICHAELSEN KF. Milk and Milk Products in Human Nutrition. *Nestlé Nutr Inst Workshop Ser Pediatr Program.* 2011;67:17-28.

CORTEZ MV, SORIA EA. The Effect of Freeze-Drying on the Nutrient, Polyphenol, and Oxidant Levels of Breast Milk. *Breastfeed Med.* 2016;11:551-554.

CRISTOFALO EA, SCHANLER RJ, BLANCO CL, et al. Randomized trial of exclusive human milk versus preterm formula diets in extremely premature infants. *J Pediatr.* 2013; 163:1592-95.

CUNHA J, MACEDO CTH, ITO MK. Influences of maternal dietary intake and suckling on breast milk lipid and fatty acid composition in low-income women from Brasilia, Brazil. *Early Hum Dev.* 2005; 81:303-11.

DARIOS F, DAVLETOV B. Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature.* 2006;440(7085):813-7.

de HALLEUX V, RIGO J. Variability in human milk composition : benefit of individualized. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(Suppl 2):529S-535S.

DELPLANQUE B, GIBSON R, KOLETZKO B, et al. Lipid Quality in Infant Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015;61:8-17.

de van Elten TM, Van Rossem L, Wijga AH, Brunekreef B, De Jongste JC, Koppelman GH, Smit HA. Breast milk fatty acid composition has a long-term effect on the risk of asthma, eczema, and sensitization. *Allergy.* 2015;70:1468-1476.

DONOVAN R, KELLY SG, PRAZAD P, TALATY PN, LEFAIVER C, HASTINGS ML, EVERLY DN. The effects of human milk fortification on nutrients and milk properties. *J Perinatol.* 2017;37(1):42-48.

ELISIA I, KITTS DD. Quantification of hexanal as an index of lipid oxidation in human milk and association with antioxidant components. *J Clin Biochem Nutr.* 2011;49(3): 147-152.

ERICK M. Breast milk is conditionally perfect. *Med Hypotheses.* 2018;111:82-89.

ESCUDEIR-VIECO D, VÁZQUEZ-ROMÁN S, SÁNCHEZ-PALLÁS J, URETA-VELASCO N, MOSQUEDA-PEÑA R, PALLÁS-ALONSO CR. Determination of Acidity in Donor Milk: Comparison of Results Obtained by 2 Different Analytical Methods. *J Hum Lact.* 2016; 32(4):73-75.

EUCLYDES MP. Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação adequada. 4ª ed. Viçosa: Ed. da UFV; 2014. Disponível em: <http://www.sbp.com.br/pdfs/Seguimento_prematuro_ok.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2015.

FIOCRUZ (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ). Programa Nacional de Qualidade em Bancos de Leite Humano. Rio de Janeiro. 2003.

FLEITH M, CLANDININ MT. Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45:205-29.

FUKAYA T, GONDAIRA T, KASHIYAE Y, KOTANI S, ISHIKURA Y, FUJIKAWA S et al. Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats. *Neurobiol Aging.* 2007;28(8):1179-86.

FUSCH G, KWAN C, KOTRRI G, FUSCH C. “Bed Side” Human Milk Analysis in the Neonatal Intensive Care Unit A Systematic Review. *Clin Perinatol.* 2017; 44:209-267.

FUSCH G, ROCHOW N, CHOI A, et al. Rapid measurement of macronutrients in breast milk: how reliable are infrared milk analyzers? *Clin Nutr.* 2015;34(3):465-76.

GALLIER S, et al. A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. *Colloids Surf B.* 2015;136:329-339.

GIBSON RA, MUHLHAUSLER B, MAKRIDES M. Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern Child Nutr.* 2011;7:17-26.

GIUFFRIDA F, et al. Temporal Changes of Human Breast Milk Lipids of Chinese Mothers. *Nutrients.* 2016;8(11):715.

GONZÁLEZ HF, VISENTIN S. Nutrients and neurodevelopment: Lipids. Update. *Arch Argent Pediatr.* 2016;114(5):472-476.

GRANCE TR et al. Homologous human milk supplement for very low birth weight preterm infant feeding. *Rev Paul Pediatr. (English Edition).* 2015;33(1):28-33.

GREER FR. Feeding the premature infant in the 20th century. *J Nutr.* 2001; 131:426S-30S.

GROTE V, VERDUCI E, SCAGLIONI S, VECCHI F, CONTARINI G, GIOVANNINI M, KOLETZKO B, AGOSTONI C. Breast milk composition and infant nutrient intakes during

the first 12 months of life. *Eur J Clin Nutr.* 2016; 70:250-256.

GUBERT JK, VIERA CS, OLIVEIRA BRG, DELATORE S, SANCHES MM. Avaliação do aleitamento materno de recém-nascidos prematuros no primeiro mês após a alta. *Cienc Cuid Saúde.* 2012;11(1):146-55.

HAGGARTY P. Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy. *Eur J Clin Nutr.* 2004; 58(12):1559-70.

HAIDEN N, ZIEGLER EE. Human Milk Banking. *Ann Nutr Metab.* 2016;69(suppl 2):8-15.

HARDING JE, CORMACK BE, ALEXANDER T, ALSWEILER JM, BLOOMFIELD FH. Advances in nutrition of the newborn infant. *Lancet.* 2017; 389(10079):1660-1668.

HARTMANN, BT. Ensuring Safety in Donor Human Milk Banking in Neonatal Intensive Care. *Clin Perinatol.* 2017;44:131-149.

HAVEMOSE MS, WEISBJERG MR, BREDIE WLP, NIELSEN JH. Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. *Int Dairy J.* 2004; 14:563-570.

HAVLICEKOVA Z, et al. Beta-palmitate - a natural component of human milk in supplemental milk formulas. *Nutr J.* 2016;17:15-28.

HAY JR WW, HENDRICKSON KC. Preterm formula use in the preterm very low birth weight infant. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017;22(1):15-22.

HAY JR WW, LUCAS A, HEIRD WC, ZIEGLER E, LEVIN E, GRAVE GD et al. Workshop Summary: nutrition of the extremely low birth weight infant. *Pediatrics.* 1999; 104(6):1360-8.

HIGGINS RD, et al. Executive summary of the workshop: Nutritional challenges in the high risk infant. *J Pediatr.* 2012;160(3):511-6.

HUANG HL, et al. Docosahexaenoic acid in maternal and neonatal plasma phospholipids and milk lipids of Taiwanese women in Kinmen: fatty acid composition of maternal blood, neonatal blood and breast milk. *Lipids Health Dis.* 2013;6:12-27.

INNIS SM. Palmitic Acid in Early Human Development. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(12):1952-1959.

INNIS SM. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr.* 2003;143 Suppl 4:1-8.

INNIS SM. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv Exp Med Biol.* 2004; 554:27-43.

JENSEN CL, VOIGT RG, PRAGER TC, ZOU YL, FRALEY JK, ROZELLE JC et al. Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82(1):125-32.

KANMAZ HG, et al. Human milk fortification with differing amounts of fortifier and its association with growth and metabolic responses in preterm infants. *J Hum Lact.* 2013; 29(3):400-405.

KIM JH, CHAN CS, VAUCHER YE, STELLWAGEN, LM. Challenges in the practice of human milk nutrition in the neonatal intensive care unit. *Early Hum Dev.* 2013;89:S35–S38.

KIM H, KANG S, JUNG BM, YI H, JUNG JI A, CHANG N. Breast milk fatty acid composition and fatty acid intake of lactating mothers in South Korea. *Br J Nutr.* 2017;117:556–561.

KLEIN CJ. Nutrient requirements for preterm infant formulas. *J Nutr.* 2002; 132(6 Suppl 1):1395S-577S.

KOLETZKO B, et al. Physiological Aspects of Human Milk Lipids and Implications for Infant Feeding: A Workshop Report. *Acta Paediatr.* 2011;100(11):1405-15.

KOLETZKO B, LARQUÉ E, DEMMELMAIR H. Placental Transfer of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LC-PUFAs). *J Perinat Med.* 2007; 35(Suppl1):S5-11.

KOLETZKO B, RODRIGUEZ-PALMERO M, DEMMELMAIR H, FIDLER N, JENSEN R, SAUERWALD T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum Dev.* 2001;65(Suppl 2):3-18.

KREISSL A, ZWIAUER V, REPA A, BINDER C, HANINGER N, JILMA B, ANGELIKA B, NADJA H. Effect of fortifiers and additional protein on the osmolarity of human milk- is it still safe for the premature infant? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;57(4):432-7.

KUIPERS RS, FOKKEMA MR, SMIT EN, VAN DER MEULEN J, BOERSMA ER, MUSKIET FA. High contents of both docosahexaenoic and arachidonic acids in milk of women consuming fish from lake Kitangiri (Tanzania): targets for infant formulae close to our ancient diet? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005;72:279–88.

KUNZ C, RODRIGUEZ-PALMERO M, KOLETZKO B, JENSEN R. Nutritional and biochemical properties of human milk. Part I: general aspects, proteins and carbohydrates. *Clin Perinatol.* 1999;26(2):307-33.

KUS MMM, FILHO JM. Ácidos Graxos: Eicosapentaenoico (EPA) e Docosahexaenoico (DHA). ILSI Brasil – International Life Sciences Institute do Brasil, 2010. Série de Publicações ILSI Brasil: funções plenamente reconhecidas de nutrientes; n.17

LIMA MF, HENRIQUES CA, SANTOS FD, ANDRADE PMM, TAVARES-DO-CARMO MG. Ácido graxo ômega 3 docosahexaenóico (DHA: C22:6 n-3) e desenvolvimento neonatal: aspectos relacionados a sua essencialidade e suplementação. *Nutrire Rev Soc Bras Aliment Nutr.* 2004; 28:65-77.

LIU Z, COCKS BG, ROCHFORD S. Comparison of Molecular Species Distribution of DHA-Containing Triacylglycerols in Milk and Different Infant Formulas by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2016;64(10):2134-44.

LOPEZ C, MADEC MN, JIMENEZ-FLORES R. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chem.* 2010;120(1):22-33.

LOZANO B, CASTELLOTE AI, MONTES R, LÓPEZ-SABATER MC. Vitamins, fatty acids, and antioxidant capacity stability during storage of freeze-dried human milk. *Int J Food Sci Nutr.* 2014;65(6):703-7.

MARTINEZ FE, CAMELO JR JS. Alimentação do recém-nascido pré-termo. *J pediatri (Rio J).* 2001; 77(suppl1): 32-40.

MARTINEZ FE, DESAI ID, DAVIDSON AG, NAKAI S, RADCLIFFE A. Ultrasonic Homogenization of Expressed Human Milk to Prevent Fat Loss During Tube Feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1987; 6(4):593-7.

MASS C, FRANZ AR, SHUNOVA A, MATHES M, BLEEKER C, POETS CF, SCHLEICHER E, BERNHARD W. Choline and polyunsaturated fatty acids in preterm infants' maternal milk. *Eur J Nutr.* 2017; 56(4): 1733-1742.

MCLEOD G et al. Comparing different methods of human breast milk fortification using measured v. assumed macronutrient composition to target reference growth: a randomised controlled trial. *Br J Nutr.* 2016;115(3):431-439.

MCNELIS K, FU TT, POINDEXTER B. Nutrition for the Extremely Preterm Infant. *Clin Perinatol.* 2017;44(2):395-406.

MENA PM. Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPICL): seus efeitos no Recém-nascido Pré-termo. In: Pereira GR, Leone CR, Navantino AF, Trindade OF. *Nutrição do Recém-nascido Pré-termo.* Rio de Janeiro: Medbook; 2008. p.69-79.

MEREDITH-DENNIS L, XU G, GOONATILLEKE E, LEBRILLA CB, UNDERWOOD MA, SMILOWITZ JT. Composition and Variation of Macronutrients, Immune Proteins, and Human Milk Oligosaccharides in Human Milk From Nonprofit and Commercial Milk Banks. *J Hum Lact.* 2018; 34(1):120-129.

MICHALSKI MC, BRIARD V, MICHEL F, TASSON F, POULAIN P. Size distribution of fat globules in human colostrum, breast milk and infant formula. *J Dairy Sci.* 2005; 88(6):1927-40.

NEWELL SJ. Enteral feeding of the micropremie. *Clin Perinatol.* 2000; 27(1):221-34.

NISHIMURA RY, CASTRO GS, JORDÃO JR AA, SARTORELLI DS. Breast milk fatty acid composition of women living far from the coastal area in Brazil. *J Pediatr (Rio J).* 2013;89(3):263-8.

NOVAK FR, ALMEIDA JAG. Teste alternativo para a detecção de coliformes em leite humano ordenhado. *J Pediatr (Rio J).* 2002;78(3) :587-591.

OOSTING A, VAN VLIES N, KEGLER D, SCHIPPER L, ABRAHAMSE-BERKEVELD M, RINGLER S et al. Effect of dietary lipid structure in early postnatal life on mouse adipose

tissue development and function in adulthood. *Br J Nutr.* 2014;111(2): 215-226.

PAMPLONA R, et al. Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J Lipid Res.* 1998;39(10):1989-1994.

PEILA C, MORO GE, BERTINO E, CAVALLARIN L, GIRIBALDI M, GIULIANI F, CRESI F, COSCIA A. The Effect of Holder Pasteurization on Nutrients and Biologically-Active Components in Donor Human Milk: A Review. *Nutrients.* 2016. 8(8):477.

PICAUD JC, BUFFIN R. Human Milk-Treatment and Quality of Banked Human Milk. *Clin Perinatol.* 2017;44(1):95-119.

RAITEN DJ, STEIBER AL, HAND RK. Executive summary: evaluation of the evidence to support practice guidelines for nutritional care of preterm infants-the Pre-B Project. *Am J Clin Nutr.* 2016;103: 599S-605S.

REZENDE MB, et al. Prevalência do aleitamento materno em recém-nascidos de muito baixo peso: método alternativo versus tradicional na alimentação. *Rev Med Minas Gerais.* 2014; 24(2):143-149.

RIBEIRO M, BALCAO V, GUIMARAES H, ROCHA G, MOUTINHO C, MATOS C, ALMEIDA C, CASAL S, GUERRA A. Fatty Acid Profile of Human Milk of Portuguese Lactating Women: Prospective Study from the 1st to the 16th Week of Lactation. *Ann Nutr Metab.* 2008;53:50–56.

RICHARD C, LEWIS ED, FIELD CJ. Evidence for the essentiality of arachidonic and docosahexaenoic acid in the postnatal maternal and infant diet for the development of the infant's immune system early in life. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016;41(5):461-75.

ROCHOW N, FUSCH G, CHOI A, et al. Target fortification of breast milk with fat, protein, and carbohydrates for preterm infants. *J Pediatr.* 2013;163(4):1001-7.

ROCHOW N, LANDAU-CRANGLE E, FUSCH C. Challenges in breast milk fortification for preterm infants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015;18(3):276-84.

ROMEU-NADAL M, CASTELLOTE AI, GAYÀ A, LOPEZ-SABATER MC. Effect of pasteurisation on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. *Food Chem.* 2008;107(1):434-438.

SAPHIER O, BLUMENFELD J, SILBERSTEIN T, TZOR T, BURG A. Fatty Acid Composition of Breastmilk of Israeli Mothers. *Indian Pediatr.* 2013; 50:1044-1046.

SCHANLER RJ. The use of human milk for premature infants. *Pediatr Clin North Am.* 2001;48(1):207-19.

SENTERRE T. Practice of enteral nutrition in very low birth weight and extremely low birth weight infants. *World Rev Nutr Diet.* 2014;110:201-14.

SHERRY CL, OLIVER JS, MARRIAGE BJ. Docosahexaenoic acid supplementation in lactating women increases breast milk and plasma docosahexaenoic acid concentrations and

alters infant omega 6:3 fatty acid ratio. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2015;95:63-9.

SHOFIAN NM, HAMID AA, OSMAN A, SAARI N, ANWAR F, DEK MSP, HAIRUDDIN MR. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *Int J Mol Sci*. 2011;12:4678-4692.

SILVA VG. Normas técnicas para banco de leite humano: uma proposta para subsidiar a construção para Boas Práticas. Tese (Doutorado em Saúde da Mulher e da Criança) – Instituto Fernandes Figueira/Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2004.

SOUZA SANTOS DA COSTA R, et al. Trans Fatty Acids in Colostrum, Mature Milk and Diet of Lactating Adolescents. *Lipids*. 2016;51(12):1363-1373

SOUSA SG, DELGADILLO I, SARAIVA JA. Human Milk Composition and Preservation: Evaluation of High-pressure Processing as a Nonthermal Pasteurization Technology. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56(6):1043-1060.

SULLIVAN S, SCHANLER RJ, KIM JH, PATEL AL, TRAWOGER R, KIECHL-KOHLENDORFER U, et al. An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. *J Pediatr*. 2010;156:562-7.

SZABÓ É, BOEHM G, BEERMANN C, WEYERMANN M, BRENNER H, ROTHENBACHER D, DECSI T. Fatty Acid Profile Comparisons in Human Milk Sampled From the Same Mothers at the Sixth Week and the Sixth Month of Lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50:316–320.

THOMAZ DM, SERAFIM PO, PALHARES DB, MELNIKOV P, VENHOFEN L, VARGAS MO. Comparison between homologous human milk supplements and a commercial supplement for very low birth weight infants. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88(2):119-24.

TUDEHOPE DI. Human Milk and the Nutritional Needs of Preterm Infants. *J Pediatr* 2013;162:17-25.

UAUY R, CASTILLO C. Lipid requirements of infants: implications for nutrient composition of fortified complementary foods. *J Nutr*. 2003;133(9):2962S-72S.

UAUY R, DANGOUR AD. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. *Nutr Rev*. 2006;64:24-33.

VIEIRA AA, SOARES FVM, PIMENTA HP, ABRANCHES AD, MOREIRA MEL. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Hum*. 2011; 87(8):577-580.

WANG ZJ, LIANG CL, LI GM, YU CY, YIN M. Neuroprotective effects of arachidonic acid against oxidative stress on rat hippocampal slices. *Chem Biol Interact*. 2006;163(3):207-17.

WEGMAN ME. Infant mortality in the 20th century, dramatic but uneven progress. *J nutr*.

2001;131(2):401S-8S.

WIGHT NE. Donor human milk for preterm infants. J. Perinatol. 2001;21(4):249-254.

YAKES JIMENEZ E, et al. Breast milk from women living near Lake Malawi is high in docosahexaenoic acid and arachidonic acid. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2015;95:71-78.

YUHAS R, PRAMUK K, LIEN EL. Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA. Lipids. 2006;41:851-8.

ANEXOS

ANEXO A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu,.....

RG:....., abaixo assinada, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam no documento “Esclarecimentos ao Sujeito do Estudo” de que se trata o projeto intitulado” **Elaboração de um concentrado com liofilizado de leite humano para alimentação de recém-nascido pré-termo de muito baixo peso**”, concordo em participar da pesquisa que será realizada com a utilização de uma única amostra de meu leite excedente, na qual será criado um pó do leite humano utilizado para complementar no próprio leite humano para alimentação de recém – nascido de muito baixo peso, que estou doando espontaneamente para o Banco de Leite Humano do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Entendi a importância dessa pesquisa que busca a melhoria para alimentação de recém-nascido prematuro de muito baixo peso e da qualidade do leite distribuído pelo Banco de Leite Humano.

Estou informada que essa amostra de meu leite não terá a identificação de minha pessoa e que o sigilo em relação à minha identidade será garantido e que esse projeto não trará nenhum risco para minha saúde.

O material usado para a coleta do leite será fornecido pelo pesquisador, não representando nenhum gasto de minha parte e, se por algum motivo eu decidir não mais participar desta pesquisa, terei inteira liberdade de recusar e retirar o meu consentimento sem que por isso seja penalizada e, sem qualquer perda em termos de assistência por parte do serviço do Banco de Leite Humano, apenas será necessária a comunicação imediata da minha decisão à responsável pelo projeto.

Telefones: 16-3610 8686 ou 16- 91216666.

Ribeirão Preto,..... de de 20.....

Assinatura da doadora de leite humano

.....

ANEXO B

C4:0 (Ácido butírico)

C6:0 (Ácido capróico)

C8:0 (Ácido caprílico)

C10:0 (Ácido cáprico)

C11:0 (Ácido undecílico)

C12:0 (Ácido láurico)

C13:0 (Ácido tridecanóico)

C14:0 (Ácido mirístico)

C14:1 (Ácido miristoléico)

C15:0 (Ácido pentadecanóico)

C15:1 (Ácido cis-10 pentadecenóico)

C16:0 (Ácido palmítico)

C16:1 (Ácido palmitoléico)

C17:0 (Ácido margárico)

C17:1 (Ácido cis-10 heptadecanóico)

C18:0 (Ácido esteárico)

C18:1 n-9c (Ácido oléico)

C18:2 n-6 (Ácido linoléico)

C18:3 n-3 (Ácido α -linolênico)

C18:3 n-6 (Ácido γ - linoléico)

C20:0 (Ácido araquídico)

C20:1 n-9 (Ácido gadoléico)

C20:2 (Ácido 11,14 eicosadienóico)

C20:3 n-3 (Ácido eicosatrienóico)

C20:3 n-6 (Ácido dihomo - γ linoléico)

C20:4 n-6 (Ácido araquidónico)

C20:5 n-3 (Ácido eicosapentaenóico)

C21:0 (Ácido heneicosanóico)

C22:1 n-9 (Ácido erúcico)

C22:2 (Ácido 13, 16 - docosadienóico)

C22:6 n-3 (Ácido docosaheptaenóico)

C24:0 (Ácido lignosérico)

C24:1 n-9 (Ácido lignocerólico)