



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E NUTRIÇÃO



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E EFEITO DAS CONDIÇÕES DE
CONGELAMENTO E DA INCIDÊNCIA DE LUZ SOBRE OS TEORES DE RETINOL
E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO LEITE HUMANO**

JAÍSA OLIVEIRA CHAVES

Ouro Preto - MG

2018

JAÍSA OLIVEIRA CHAVES

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E EFEITO DAS CONDIÇÕES DE
CONGELAMENTO E DA INCIDÊNCIA DE LUZ SOBRE OS TEORES DE RETINOL
E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO LEITE HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, área de concentração Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Carvalho Menezes

Coorientadoras: Profa. Dra. Luciana Rodrigues da Cunha e Profa. Dra. Maria Cristina Passos

Ouro Preto - MG

2018

C512q

Chaves, Jaísa Oliveira.

Qualidade microbiológica e efeito das condições de congelamento e da incidência de luz sobre os teores de retinol e capacidade antioxidante total do leite humano [manuscrito] / Jaísa Oliveira Chaves. - 2018.

95f.: il.: color; tabs; figuras.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camila Carvalho Menezes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Departamento de Nutrição . Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição .

Área de Concentração: Saúde e Nutrição.

1. Leite materno. 2. Fotoxidação. 3. Vitamina A. 4. Antioxidantes. 5. Microbiologia. I. Menezes, Camila Carvalho. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 613.2



UFOP

Universidade Federal de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Nutrição – ENUT

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição



ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e seis dias do mês de junho de dois mil e dezoito, às nove horas, na sala de Reuniões da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, por meio de *webconferência*, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Jaísa Oliveira Chaves**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelas professoras Patrícia Aparecida Pimenta Pereira (UFOP), Raquel Maria Amaral Araújo (UFV), Maria Cristina Passos (UFOP) e Luciana Rodrigues da Cunha (UFOP). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua Dissertação de Mestrado intitulada: “**Qualidade microbiológica e efeito das condições de congelamento e da incidência de luz sobre os teores de retinol e capacidade antioxidante total do leite humano**”. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento do Programa. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:



APROVAR



APROVAR CONDICIONALMENTE



REPROVAR

Profa. Raquel Maria Amaral Araújo (UFV),
Examinadora Externa.

Profa. Patrícia Aparecida Pimenta Pereira (UFOP),
Examinadora Interna.

Profa. Maria Cristina Passos (UFOP),
Coorientadora.

Profa. Luciana Rodrigues da Cunha (UFOP),
Coorientadora.

Jaísa Oliveira Chaves,
Mestranda.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida, por sempre me guiar no caminho da luz e nunca me fazer desistir dos meus sonhos.

Aos meus amados pais, Clarinda e Wilson, meus amigos, guerreiros e incentivadores. Obrigada por todo o amor, cuidado e sustento.

Aos meus irmãos, Thiago e Larissa, pela fiel parceria de sempre, cuidado, amizade e companheirismo.

Às minhas avós maravilhosas, Cida e Maria, exemplos de vida, pelas orações e apoio em todos os momentos.

Ao meu namorado, Renato, pelo amor, companheirismo e por me apoiar sempre.

À Profa. Dra. Camila Carvalho Menezes, que competentemente me orientou nessa jornada, obrigada pela amizade, orientação e confiança que depositou em mim, seus ensinamentos foram fundamentais.

Às professoras Dra. Maria Cristina Passos e Dra. Luciana Rodrigues da Cunha, minhas coorientadoras, pelas colaborações e por toda disponibilidade em contribuir com o trabalho.

À todas as doadoras, que com muita boa vontade se dispuseram a doar o leite todas as vezes que foi necessário.

À mestranda Paola e às alunas de Iniciação Científica, Angélica, Nayara e Thaís, obrigada pela parceria incansável e dedicada.

À Lílian e Cristiane, pela ajuda e apoio durante este tempo, e o carinho que sempre tiveram comigo.

Aos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos, Bromatologia, Nutrição Experimental, Microbiologia e Multiusuário da Pós-Graduação, pela concessão de espaço físico e equipamentos e a todos os seus técnicos, Michele, Andreia, Miliane, Bhering, Lourival, Reginaldo, Gustavo, Rafael e Bruno pela ajuda, risadas e boas energias transmitidas.

Ao Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas, a todos os seus técnicos, pós-graduandos, graduandos, em especial, à técnica Ananda, ao Professor Robson Afonso e à aluna de iniciação científica Bianca, por toda a ajuda e pelo tempo destinado a me ensinar.

Ao Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ouro Preto, em especial, ao Banco de Leite Humano e a todos os funcionários, pela receptividade e permissão em recrutar as doadoras para que o desenvolvimento desse estudo fosse possível.

Às professoras Melina Oliveira de Souza e Eleonice Moreira Santos pelas contribuições na banca de qualificação.

Às professoras Raquel Maria Amaral Araújo (UFV) e Patrícia Aparecida Pimenta Pereira pelas contribuições na banca de defesa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição pelos sábios conhecimentos transmitidos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição pela oportunidade de crescimento e realização profissional.

À Escola de Nutrição – ENUT pela concessão de espaço físico, laboratórios e equipamentos.

À turma de graduação da disciplina Nutrição da Criança e do Adolescente 2016.2 pela oportunidade de aprendizado em minha primeira experiência na docência.

À turma do mestrado 2016, onde construí grandes amizades, obrigada por todos os momentos felizes.

A todos os familiares, amigos e colegas, que torcem por mim!

À Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP, pelo estímulo à aquisição e expansão de conhecimento e pela concessão da bolsa de estudos de mestrado.

À Ouro Preto, cidade encantadora, que me acolheu maravilhosamente e que hoje, se tornou um dos meus lugares favoritos. Muito obrigada!

RESUMO

Os Bancos de Leite Humano (BLH) são responsáveis pela captação, processamento e armazenamento em condições seguras do leite humano doado. Sabe-se que essas etapas de manipulação do leite humano (LH) podem interferir na sua qualidade nutricional e funcional, no entanto, as evidências científicas ainda não são bem esclarecidas. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito das condições de armazenamento (tempos/temperaturas de congelamento e efeito da incidência de luz) sobre os teores de retinol e a capacidade antioxidante total (CAT) do LH, bem como a sua qualidade microbiológica. Na primeira etapa do estudo foi avaliado o efeito de diferentes tempos e temperaturas de congelamento sobre a CAT no leite humano cru (LHC) por dois métodos *in vitro* (ABTS e DPPH). Na segunda etapa foi avaliado o impacto da luz, conferido pela utilização de diferentes frascos de vidro (transparente, transparente recoberto por papel alumínio e âmbar) sobre os teores de retinol e a CAT no leite humano pasteurizado (LHP). A qualidade microbiológica do LHC doado pelas 10 doadoras que participaram do estudo foi avaliada por meio das seguintes análises realizadas em triplicata: contagens de *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e termotolerantes, mesófilos aeróbios totais, e fungos e leveduras. Também foi aplicado um questionário e um *checklist* para verificar a conformidade dos procedimentos de extração e armazenamento do leite adotados pelas doadoras. De acordo com a análise de ABTS, os níveis de CAT aumentaram significativamente durante o tempo de armazenamento nas 3 temperaturas avaliadas, ao contrário da análise por DPPH em que os níveis diminuíram significativamente com o tempo de armazenamento nas 3 temperaturas, porém as duas análises indicaram que as menores temperaturas preservaram mais a CAT. Com relação ao efeito da incidência de luz por meio dos três diferentes tipos de frascos avaliados, verificou-se que não houve interferência significativa por nenhum deles na CAT. Já em relação aos teores de retinol, verificou-se que os frascos âmbar e transparente recoberto por papel alumínio permitiram maior estabilidade do retinol contido no LH. De acordo com os resultados microbiológicos, verificou-se o crescimento de todos os microrganismos estudados nos leites de todas as doadoras e, em alguns casos, acima dos limites considerados seguros. Os resultados do *checklist* mostram que alguns procedimentos higiênico-sanitários necessários não estão sendo realizados de forma criteriosa, sendo importante a adequada orientação das mães quanto a esses aspectos de higiene.

Palavras-chave: Leite Materno. Banco de Leite Humano. Fotoxidação. Vitamina A. Antioxidantes. Microbiologia.

ABSTRACT

The Human Milk Banks are responsible for the safe capture, processing and storage of donated human milk. It is known that these steps in the manipulation of human milk (HM) can interfere in its nutritional and functional quality, however, the scientific evidence is not yet clear. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of storage conditions (freezing times / temperatures and effect of light incidence) on retinol levels and total antioxidant capacity (TAC), as well as their microbiological quality. In the first stage of the study the effect of different times and freezing temperatures on TAC in raw human milk was evaluated by two in vitro methods (ABTS and DPPH). In the second stage, the impact of the light, verified by the use of different glass bottles (transparent, transparent covered by aluminum foil and amber) on retinol and TAC content in pasteurized human milk was evaluated. The microbiological quality of the raw human milk donated by the 10 donors participating in the study was evaluated by means of the following analyzes performed in triplicate: counts of *Staphylococcus aureus*, total and thermotolerant coliforms, total aerobic mesophiles, and fungi and yeasts. A questionnaire and a checklist were also applied to verify the conformity of the milk extraction and storage procedures adopted by the donors. According to the ABTS analysis, TAC levels increased significantly during the storage time at the 3 temperatures evaluated, unlike the DPPH analysis in which the levels decreased significantly with the storage time at the 3 temperatures, however the two analyzes indicated that the lower temperatures preserved the TAC more. Regarding the effect of light incidence through the three different types of flasks evaluated, it was verified that there was no significant interference by any of them in TAC. Regarding the retinol contents, it was verified that the amber and transparent bottles covered by aluminum foil allowed for a greater stability of the retinol contained in the HM. According to the microbiological results, the growth of all the microorganisms studied in the milk of all the donors was verified, and in some cases, above the limits considered safe. The results of the checklist show that some necessary hygienic-sanitary procedures are not being performed in a judicious way, being important the adequate orientation of the mothers regarding these aspects of hygiene.

Keywords: breast milk; milk bank; photooxidation; vitamin A; antioxidants; microbiology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Atividade sequestradora do radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico) do leite humano armazenado em diferentes temperaturas ao longo do tempo de congelamento.....53
- Figura 2** Atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) do leite humano armazenado em diferentes temperaturas ao longo do tempo de congelamento.....55
- Figura 3** Atividades sequestradoras dos radicais livres ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico) (A) e DPPH ((2,2-difenil-1-picrilhidrazila) do leite humano armazenado em diferentes tipos de embalagens de vidro.....58
- Figura 4** Teores de retinol no leite humano armazenado em diferentes tipos de embalagens de vidro.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Caracterização das doadoras e de seus lactentes, Ouro Preto, MG, 2018.....	44
Tabela 2 Procedimentos recomendados para extração e coleta de leite humano no domicílio das doadoras, Ouro Preto, MG, 2018.....	45
Tabela 3 Contagem das análises microbiológicas de leite humano cru extraído em domicílio expressos em logaritmos.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LH	Leite humano
LHC	Leite humano cru
LHP	Leite humano pasteurizado
LHD	Leite humano doado
BLH	Banco de leite humano/Bancos de leite humano
RN	Recém-nascido/Recém-nascidos
UTIN	Unidades de terapia intensiva neonatal
CAT	Capacidade antioxidante total
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
CT	Coliformes totais
CTT	Coliformes termotolerantes
NMP	Número mais provável
UFC	Unidades formadoras de colônias
MS	Ministério da Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RBBLH	Rede Brasileira de Banco de Leite Humano
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ENUT	Escola de Nutrição
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
PCA	Plate Count Agar
BDA	Batata Dextrose Agar
LST	Caldo Lauril Sulfato de Sódio
VB	Caldo verde brilhante 2%
EC	Caldo Escherichia coli
D1	Doadora 1
D2	Doadora 2
D3	Doadora 3
D4	Doadora 4
D5	Doadora 5

D6	Doadora 6
D7	Doadora 7
D8	Doadora 8
D9	Doadora 9
D10	Doadora 10
ERO	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
GPx	Glutathiona peroxidase
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
DVA	Deficiência de vitamina A
BHT	Butilato hidroxitolueno
HPLC	High performance liquid chromatograph

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	133
2 JUSTIFICATIVA	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 LEITE HUMANO	16
3.2 BANCO DE LEITE HUMANO.....	20
3.3 EXTRAÇÃO DOMICILIAR DO LEITE HUMANO	22
3.4 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE HUMANO.....	23
3.5 VITAMINA A NO LEITE HUMANO	26
3.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE NO LEITE HUMANO	29
3.7 INTERFERÊNCIA DO PROCESSAMENTO E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO SOBRE OS COMPOSTOS DO LEITE HUMANO	31
3.7.1 <i>Efeito da pasteurização sobre os compostos do leite humano</i>	31
3.7.2 <i>Efeitos do congelamento sobre a capacidade antioxidante total do leite humano</i> ..	33
3.7.3 <i>Características das embalagens e efeitos da incidência de luz sobre os compostos do leite humano</i>	34
4 OBJETIVOS	38
4.1 OBJETIVO GERAL.....	38
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS DOADORAS	39
5.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA	39
5.2.1 <i>Análises microbiológicas</i>	39
5.3 ESTUDO EXPERIMENTAL.....	41
5.3.1 <i>Avaliação do efeito do tempo e temperaturas de congelamento sobre a capacidade antioxidante total no leite humano cru</i>	41
5.3.2 <i>Avaliação do efeito da incidência de luz sobre os teores de retinol e capacidade antioxidante total no leite humano pasteurizado</i>	42
5.4 DETERMINAÇÕES QUÍMICAS.....	42
5.4.1 <i>Capacidade antioxidante total</i>	42
5.4.1.1 <i>Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)</i>	42
5.4.1.2 <i>Método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico)</i>	43

5.4.1 Vitamina A (retinol)	43
5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.1 <i>Qualidade higiênico-sanitária do leite humano</i>	47
6.2 <i>Efeito do tempo e temperaturas de congelamento sobre a capacidade antioxidante total do leite humano</i>	52
6.3 <i>efeito da incidência de luz durante o transporte e processamento do leite humano sobre a sua capacidade antioxidante total e teores de retinol</i>	56
7 CONCLUSÃO	62
8 REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE A	88
ANEXO A	90
ANEXO B	93
ANEXO C	95

1 INTRODUÇÃO

O LH é um alimento nutricionalmente completo, específico para os recém-nascidos (RN), apresentando uma perfeita composição química, que os beneficia do ponto de vista nutricional, imunológico, psicológico e cognitivo (VASCONCELOS et al., 2011). É composto por lipídios, proteínas, carboidratos, vitaminas, enzimas, minerais e fatores imunológicos (HASSIOTOU; GEDDES, 2012). As vitaminas e enzimas apresentam capacidade antioxidante, protegendo contra infecções e reduzindo sua severidade, sendo elas: enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e coenzima Q10 (LINDMARK-MANSSON; AKESSON, 2000) e as vitaminas E, C e A (TIJERINA-SÁENZ, 2009).

A alta concentração de antioxidantes no LH tem um papel fundamental para os neonatos, pois ele é naturalmente baixo em seus organismos, enquanto o estresse oxidativo é alto. Dessa forma, durante o período neonatal, o estresse oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento ou piora de diversas doenças como, enterocolite necrosante, leucomalácia periventricular, hemorragia intraventricular e retinopatia (ZHOU et al., 2005; INDER; VOLPE, 2000; PAPP et al., 1999). A vitamina A também tem seu lugar de destaque no LH, pois está envolvido na reprodução, no ciclo visual e na diferenciação celular, afetando então, processos fisiológicos como o crescimento, o desenvolvimento embrionário e a integridade do sistema imunológico (DIMENSTEIN et al., 2003).

O BLH é um serviço especializado vinculado à um Hospital de atenção materna e/ou infantil, que tem como responsabilidades ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno e execução de atividades de coleta do LH, seleção, classificação, processamento, controle de qualidade e distribuição (BRASIL, 2008; HINRICHSEN, 2004; BRITTO, 2002). Regularmente, os BLH submetem o leite humano doado (LHD) à pasteurização seguida de congelamento para preservação da sua qualidade microbiológica. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nº 171/2006 (BRASIL, 2006) e o manual do BLH: “Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos” elaborado pela ANVISA em 2008 (BRASIL, 2008), afirmam que para o armazenamento de LHC quando este não é utilizado após a sua extração, deve ser imediatamente refrigerado a no máximo 5 °C por até 12 horas ou congelado a no máximo -3 °C por até 15 dias e, após a pasteurização, ele poderá ser congelado a no máximo -3 °C por um período de até 6 meses.

Os BLH do país fazem parte da Rede Brasileira de Bancos de Leite (RBBLH). A Rede foi uma iniciativa do Ministério da Saúde (MS) e da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), funciona desde 1943 e mantém suas atividades em todo o país (BRASIL, 2008). A RBBLH (2005) e a ANVISA salientam que a extração do LH pode ser realizada fora do BLH, no domicílio da doadora (BRASIL, 2008), entretanto, a possibilidade de contaminação do LH extraído é um fato que preocupa, sobretudo se a extração e o pré-armazenamento ocorrem na casa da doadora longe da supervisão da equipe capacitada. Muitas vezes, a extração do LH compreende o manuseio demorado do mesmo, o que pode pôr a sua qualidade em risco (NOVAK et al., 2001).

O tratamento térmico e as condições de armazenamento são etapas do processamento do LH fundamentais para assegurar sua segurança microbiológica antes de serem ofertados aos RN receptores. Porém, estão dentre os pontos críticos de alteração da qualidade nutricional e bioativa do leite nos BLH, podendo alterar a sua composição, gerando perdas de nutrientes sensíveis a ação da temperatura elevada, do oxigênio e dos raios ultravioleta (PENTEADO, 2003).

As condições de armazenamento, sendo eles, temperatura/tempo de congelamento e tipo de embalagem (vidro transparente ou vidro com barreira à luz), podem afetar os componentes do LH, com a perda de algumas propriedades importantes. Estudos anteriores demonstraram alterações nos níveis de alguns compostos do LH durante o armazenamento, como a CAT e a vitamina A (GUTIERREZ et al., 2018; UNAL et al., 2017; BROTHERSEN et al., 2016; AYYAPPAN et al., 2015; AKSU et al., 2014; LOZANO et al., 2014; SARI et al., 2012; GUNESER; KARAGUL-YUCEER, 2012; XAVIER et al., 2011).

Os frascos utilizados nos BLH e nos domicílios para armazenamento do LH são do tipo vidro transparente e tampa plástica rosqueável. Desse modo, todo o processamento do leite, incluindo as etapas de coleta, pasteurização e distribuição, ocorre sob incidência de luz. A luz gera reações de foto-oxidação sobre os componentes do LH, afetando negativamente, sobretudo, as vitaminas lipossolúveis e os antioxidantes. Ela acelera a decomposição desses compostos, principalmente na presença de sensibilizadores (riboflavina), que absorvem energia luminosa passando para o estado excitado e, posteriormente, essa energia é transferida para o oxigênio passando para o estado singleto, tudo isso acarreta, principalmente, em redução de capacidade antioxidante e de vitaminas (ZAMBIANI, 1999).

Visto isso, pode-se considerar que as características de armazenamento determinam a qualidade do LH até o momento de consumo, contudo, as condições ótimas que geram as

menores alterações nos compostos do LH ainda não estão claramente demonstradas na literatura (MARINKOVIC et al., 2016; AKDAG et al., 2014; LOZANO et al., 2014; AKSU et al., 2014; SARI et al., 2012). Portanto, faz-se necessário avaliar os efeitos de diferentes temperaturas e tempos de congelamento, além da interferência da luz sobre os componentes do LH, neste estudo, em especial, sobre os teores de retinol e a CAT.

2 JUSTIFICATIVA

Em situações específicas, alguns RN não podem ser amamentados diretamente por suas mães. Tal ocorrência se torna ainda mais preocupante quando se trata de bebês prematuros que têm o LH como melhor opção para suprir suas necessidades nutricionais e de componentes com capacidade funcional que irão, entre outros benefícios, auxiliar na redução do estresse oxidativo ocasionado pela situação singular em que se encontram. Há casos em que esses bebês necessitam receber assistência médica necessária e adequada para manter suas funções vitais, por meio de internação, ficando separados de suas mães. Neste sentido, os centros de assistência à saúde materna e/ou infantil que possuem um BLH podem ofertar o leite da própria mãe ou LHD como primeira opção para os RN de risco e/ou doentes, contribuindo com a redução de desenvolvimento de doenças e da mortalidade neonatal.

As doadoras podem fazer a extração do LH em seus próprios domicílios ou no BLH, seguindo todos os procedimentos estabelecidos na Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, RDC nº 171/2006 (BRASIL, 2006), presentes no Manual “Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos” (BRASIL, 2008), os quais são repassados a elas pelos profissionais responsáveis pelo serviço. Todo o procedimento para a extração do LH deve ser conduzido com rigor higiênico-sanitário capaz de garantir sua qualidade microbiológica, bioativa e nutricional que serão empregados na alimentação de bebês prematuros e de extremo baixo peso.

A avaliação da qualidade microbiológica do LH neste estudo é de grande relevância, pois mostrará o perfil de qualidade higiênico-sanitária dos leites das doadoras cadastradas no BLH da Santa Casa de Misericórdia de Ouro Preto que foram devidamente orientadas, e de acordo com os resultados obtidos, se houver necessidade, o BLH poderá adotar protocolos de ações mais eficientes para treinamento e conscientização das doadoras, melhorando a qualidade dos leites recebidos e, conseqüentemente, a segurança para as crianças que o receberão.

Até o momento, os estudos existentes não revelam o real impacto das condições de armazenamento do LH adotado pelos BLH no Brasil sobre seus compostos, principalmente em relação aos efeitos da temperatura e tempo de congelamento, e da incidência de luz, por meio de diferentes tipos de embalagens de vidro, sobre os teores de retinol e a CAT. Diante da importância já documentada desses compostos para o crescimento, desenvolvimento e saúde das crianças, torna-se extremamente importante avaliar a estabilidade dos mesmos de acordo com os procedimentos adotados pela RBBLH.

Dessa forma, este estudo possibilitará a detecção de pontos críticos, que poderão ser avaliados e, se possível, alterados, para garantir a melhor qualidade nutricional, funcional e microbiológica do LH. Os resultados das análises servirão de subsídios para promover uma melhoria no controle de qualidade dos serviços que compõem a RBBLH, visando fornecer um leite de qualidade ainda maior, com menores alterações nutricionais e funcionais.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LEITE HUMANO

O LH é reconhecido mundialmente como o melhor alimento para a nutrição e saúde do lactente, fornecendo todos os nutrientes essenciais que os bebês precisam, do ponto de vista nutricional e imunológico, apresentando características únicas, diferenciando-o do leite de vaca e de fórmulas infantis comerciais (BRASIL, 2010). Desse modo, a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2013) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF, 2015) recomendam o aleitamento materno exclusivo, desde o nascimento até os seis meses de idade, e, em seguida, introduzir alimentos complementares, continuando com o aleitamento materno até os dois anos ou mais.

Ao contrário da fórmula infantil que apresenta uma composição padronizada, o LH possui uma composição que muda dinamicamente, de acordo com a hora do dia, da fase de lactação, entre as mães e populações, características genéticas, idade da criança, estado nutricional e situação socioeconômica (QUILES et al., 2006; CALIL; FALCÃO, 2003). Ele é influenciado por fatores genéticos e ambientais, sexo do bebê (POWE et al., 2010), estado infeccioso (RISKIN et al., 2012) e estilo de vida materno, incluindo os hábitos alimentares (BALLARD; MORROW, 2013; SAARELA et al., 2005).

A composição do LH modifica-se progressivamente ao longo da lactação, o que o classifica em três fases. Cada uma delas apresenta características distintas (GOLINELLI et al., 2014; BALLARD; MORROW, 2013;), sendo elas: o colostro (até o sétimo dia após o parto), o leite de transição (do sétimo ao décimo quarto dia pós-parto) e o leite maduro (a partir do décimo quarto dia pós-parto) (BRASIL, 2008).

O colostro, leite produzido nos primeiros dias pós-parto, é viscoso, de coloração amarela, com concentração elevada de alguns componentes como oligossacarídeos, proteínas, minerais, vitaminas lipossolúveis, particularmente, A e E, fatores imunológicos (MENON; WILLIAMS, 2013; CALIL; FALCÃO, 2003; NASCIMENTO; ISSLER, 2003) e teor reduzido de gorduras e carboidratos, em comparação aos leites de transição e maduro (EUCLYDES, 2014; RIORDAN, 1999). Ele apresenta grandes concentrações de IgA, citocinas, receptores solúveis destas citocinas e fatores de crescimento, muito importantes para a proteção dos RN, uma vez que seus órgãos são imaturos (CASTELLOTE et al., 2011; CHANTRY et al., 2009). A CAT do LH é maior no colostro, quando comparada aos leites de transição e maduro (ZARBAN, 2009).

No geral, o LH consiste em carboidratos, proteínas, lipídios, minerais, vitaminas, compostos bioativos e imunológicos, todos em qualidade e quantidade adequados para a proteção, crescimento e desenvolvimento dos RN (LAWRENCE; PANE, 2007; PICCIANO, 2001). A sua composição nutricional é balanceada, incluindo todos os nutrientes essenciais, além disso, apresenta outros compostos bastante importantes, dentre eles destacam-se os agentes antiinflamatórios, as enzimas digestivas, vários tipos de hormônios, fatores de crescimento e imunológicos (GAROFALO, 2010; KUNZ et al., 1999; KOLDOVSKY, 1995).

A água é o componente presente em maior quantidade no LH (87,5%), e apresenta um papel fundamental na regulação da temperatura corporal do RN (LAMOUNIER et al., 2009). Já as proteínas do LH, o seu teor médio diminui gradativamente do segundo ao sexto mês de lactação e estabiliza-se a partir daí (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015; GIDREWICZ; FENTON, 2014). Elas contribuem para o crescimento do lactente, maturação e regulação do trato gastrointestinal, fornecem todos os aminoácidos essenciais e não-essenciais, apresentam ações enzimáticas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e imunomoduladoras. Dentre elas estão a caseína, alfa-lactalbumina, lactoferrina, lisozima, soro albumina, imunoglobulinas e beta-lactoglobulina (TUROLI et al., 2004; CALIL; FALCÃO, 2003; NAGASAWA et al., 1973).

Os carboidratos presentes no leite são a lactose, glicose, galactose, oligossacarídeos complexos e glicoproteínas. A lactose é o carboidrato que está presente em maior concentração no LH, aproximadamente 6,7 g/100 mL, em média, sendo maior ainda que de outras espécies, o que reflete os altos requisitos nutricionais do cérebro humano (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015). Vale ressaltar que a lactose corresponde a uma fonte importante de galactose, que é importante na promoção do desenvolvimento do sistema nervoso central. Os outros carboidratos significativos do LH são os oligossacarídeos, presentes numa concentração que varia de 1 a 10 g/L em leite maduro e 15 a 23 g/L no colostro. Alguns deles podem exercer funções de prebióticos, agindo como substratos metabólicos para bactérias, aumentando assim a multiplicação de bactérias benéficas no cólon dos lactentes (DONOVAN; COMSTOCK, 2016).

Os lipídios do LH são considerados a maior fonte de energia para os RN e aumentam com o tempo de lactação, além de serem uma importante fonte de nutrientes essenciais, como ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), vitaminas solúveis em lipídios, lipídios complexos e compostos bioativos (KOLETZKO, 2016). A membrana do glóbulo de gordura do leite possui uma ampla quantidade de compostos bioativos, incluindo glicerofosfolípidos, esfingolipídios, esfingomiélna, glicolipídios, colesterol e proteínas glicosiladas (CONTARINI; POVOLO, 2013). Os triacilgliceróis representam 98% dos lipídios do LH e suas propriedades são largamente afetadas pela composição de ácidos graxos.

Vale ressaltar que os nutrientes essenciais dos lipídios, são necessários como elementos estruturais para todas as membranas celulares e, como componentes integrantes dos tecidos neurais para crianças em crescimento (KOLETZKO, 2016; PICCIANO, 2001), são eles: os PUFA (linoleico e linolênico) e os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA). Os ácidos graxos essenciais linoleico e linolênico são relevantes para o desenvolvimento do sistema nervoso central, acuidade visual e proteção contra espécies reativas de oxigênio (ERO) para os lactentes (GRANOT et al., 1999). Embora suas funcionalidades ainda não sejam totalmente conhecidas, sabe-se que os variados lipídios oferecidos pelo LH são envolvidos na modulação da função gastrointestinal; no metabolismo das lipoproteínas; na composição e função das membranas, assim como nas suas vias de sinalização; acometendo significativamente o crescimento, o desenvolvimento e a saúde da criança (DUGGAN; WATKINS; WALKER, 2008).

Com relação aos micronutrientes, as principais vitaminas existentes no LH são as vitaminas do complexo B, as vitaminas A, C, D, K e E (SOUSA et al., 2014; CALIL; FALCÃO,

2003). Além disso, o LH é a principal fonte de cálcio para a criança nos primeiros meses de vida (LAMOUNIER et al., 2009; MATALOUN; LEONE, 1998; SCHANLER, 1995).

O LH também é considerado alimento probiótico, visto que possui uma comunidade microbiana diversificada, composta por mais de 200 filótipos (BODE et al., 2014). Além disso, possui também hormônios que são reconhecidos por modular o metabolismo e a composição corporal, como por exemplo, insulina, leptina, adiponectina e grelina (DEMMELMAIR; KOLETZKO, 2017; FIELDS; SCHNEIDER; PAVELA, 2016).

O ato de amamentar vai além do que simplesmente nutrir a criança, ele apresenta diversos outros benefícios, tanto para ela quanto para a mãe, destacando-se: o fortalecimento do vínculo mãe-filho, proporciona vantagens econômicas, efeito anticoncepcional, menor risco de contaminação microbiológica do leite, diminui a probabilidade do desenvolvimento de alergias para os bebês, proteção dos RN contra infecções e alergias contribui no desenvolvimento cognitivo, fisiológico e emocional dos mesmos (OMS, 2015; LUGONJA et al., 2013; CALIL; FALCÃO, 2003; ESCOBAR et al., 2002).

Com relação à saúde das crianças, inúmeros benefícios do LH já foram descritos, compreendendo a sua contribuição para o amadurecimento neurológico (INNIS, 2007; KHEDR et al., 2004) e desenvolvimento intestinal (MUSILOVA et al., 2014; GARCIA et al., 2013), como também diminuição do risco de infecções do trato respiratório (LIBSTER et al., 2009), de enterocolite necrosante (HERRMANN et al., 2014) e retinopatia em RN prematuros (MANZONI et al., 2013). As taxas de mortalidade se apresentam mais baixas de forma significativa para RN amamentados de forma exclusiva comparando-se com aqueles parcialmente amamentados (OMS, 2013). Além disso, a amamentação tem uma associação com melhores resultados na saúde na idade adulta, como: risco reduzido de desenvolver obesidade, diabetes, doença cardiovascular e outras doenças decorrentes de deficiência do metabolismo (OWEN et al., 2006; MARTIN et al., 2005; GRUMMER-STRAWN; MEI, 2004; OWEN et al., 2003).

Nas situações em que a mãe de um bebê hospitalizado não consegue prover o seu leite para o filho, sempre que possível, o LHD é considerado uma alternativa eficaz e ideal de nutrição, sendo os bebês prematuros os principais destinatários (ARSLANOGLU et al., 2013; BERTINO et al., 2013; BERTINO et al., 2012; VIEIRA et al., 2011). Segundo Quigley et al. (2014) o LHD possui vantagens únicas em relação às fórmulas infantis e é uma importante alternativa se o leite da mãe não está disponível.

O LHD é obtido a partir de nutrizes saudáveis que aceitam doar seu leite excedente. O leite é coletado, processado e armazenado por centros especializados, como o BLH, e isso ocorre para que haja eliminação microbiana, garantindo assim, a sua segurança microbiológica para o consumo dos RN. Contudo, o transporte, armazenamento e processamento térmico, que ocorrem sob a incidência de luz, afeta de forma negativa a sua qualidade nutricional, as propriedades imunológicas e bioativas do leite (O'CONNOR et al., 2015). O armazenamento (refrigeração e congelamento) do LH deve ser realizado sob condições que preservam sua qualidade até o momento do consumo, com o mínimo de deterioração de suas propriedades nutricionais (SARI et al., 2012).

3.2 BANCO DE LEITE HUMANO

O primeiro BLH do Brasil foi o do Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz, implantado em outubro de 1943, na cidade do Rio de Janeiro, com o objetivo de combater a mortalidade infantil, principalmente a neonatal. Esse passou a condição de Centro de Referência Nacional em 1987, e desde 1996, vem se consolidando como Centro de Referência para América Latina e Caribe, constituída por 221 BLH e 196 Postos de Coleta (RBBLH, 2018).

Os BLH foram criados no início para atender casos especiais, em que o LH era considerado imprescindível, mais por suas propriedades farmacológicas do que por suas qualidades nutricionais. Assim, era destinado somente às situações de emergência que não podiam ser solucionadas com a alimentação artificial, que, até então, era colocada como primeira alternativa (ALMEIDA; MAIA; NOVAK, 2004).

Em relação à trajetória dos bancos de LH no Brasil, esta pode ser dividida em três períodos distintos: de 1943 a 1984, fase inicial em que ocorreu a implantação da primeira unidade; de 1985 a 1997, período de ampliação da forma de atuação, incorporando-se atividades de promoção, proteção e apoio à amamentação; e, a partir de 1998, fase de desenvolvimento do projeto da Rede Nacional, cujo modelo refere-se a um processo de crescimento descentralizado e construção de competência técnica dos estados e municípios (MAIA et al., 2006).

Atualmente, a RBBLH tem como objetivos promover, proteger e apoiar o aleitamento materno; coletar e distribuir LH de qualidade certificada; contribuir para a redução da mortalidade infantil e somar esforços ao Pacto Nacional pela Redução da Mortalidade Materna e Neonatal (RBBLH, 2018). Os BLH ao longo das últimas décadas têm tido sua importância fortalecida pela política pública de saúde, voltada para o incentivo à amamentação, pois estes

são locais privilegiados para as ações de promoção ao aleitamento materno no território nacional. Além disso, o LH do BLH, geralmente é a alternativa mais adequada para bebês prematuros e/ou de baixo peso quando a própria mãe não pode fornecer (WIGHT, 2001; MAIA et al., 2006).

Vinculado tecnicamente aos BLH, tem o Posto de Coleta do Leite Humano (PCLH), que é uma unidade fixa ou móvel, intra ou extra-hospitalar, que é vinculada administrativamente à um serviço de saúde ou ao próprio BLH. Entre as responsabilidades do PCLH estão ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno e realização de atividades de coleta do LH e sua estocagem, não podendo efetuar as atividades de processamento, que é função exclusiva do BLH (BRASIL, 2006; BRASIL, 2001).

Com relação aos procedimentos realizados nos BLH do Brasil, o Manual “Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos” publicado em 2008 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) baseado na resolução RDC nº 171 da ANVISA (2006), constitui-se como um instrumento de apoio aos profissionais na realização e vigilância das práticas que envolvem o LH (BRASIL, 2008). De acordo com esse manual, o LHC extraído no domicílio da doadora ou no BLH deve ser congelado por um período máximo de 15 dias a partir da data da primeira coleta, a uma temperatura máxima de -3 °C. Sendo extraído no domicílio da doadora, o seu transporte até o BLH deve ser feito sob cadeia de frio e não ultrapassar 6 horas. O degelo do leite para o processo de pasteurização deve ser feito em banho-maria a uma temperatura de 40 °C e, logo após, o leite deve ser selecionado e classificado. A seleção envolve a verificação de presença de sujidades, avaliação das condições da embalagem, de cor e *off-flavor*. Já, a classificação compreende a verificação do período de lactação, acidez Dornic e conteúdo energético. A pasteurização é realizada a 62,5 °C por 30 minutos, após o tempo de pré-aquecimento. Imediatamente após a pasteurização, procede-se o resfriamento dos frascos até que o LH atinja uma temperatura igual ou inferior a 5 °C. O LHP pode ser estocado por até 6 meses a uma temperatura de no máximo -3 °C. Em relação ao consumo, o LHP submetido ao degelo deve ser mantido sob refrigeração por um período máximo de 24 horas, a temperatura limítrofe de 5 °C (BRASIL, 2008).

A doação de LH para os BLH é definida como uma ação desempenhada por nutrízes saudáveis que possuem excesso de produção de leite, além das necessidades requeridas pela criança, e que se predispõe a doá-lo por livre e espontânea vontade. Essa atividade adquiriu notoriedade com o surgimento dos BLH (BRASIL, 2018).

Todos os processamentos realizados no LH, incluindo a expressão, manuseio, transporte, análise, armazenamento e distribuição, são regulamentados pela ANVISA. Toda instituição brasileira no qual o LH é tratado, deve obrigatoriamente adotar os regulamentos e ser inspecionada pela ANVISA local, assegurando que todos os procedimentos padrões devem ser aplicados conforme a descrição nos regulamentos (BRASIL, 2008).

3.3 EXTRAÇÃO DOMICILIAR DO LEITE HUMANO

No Brasil, bem como em outros países, é permitida e incentivada que a coleta do LH seja realizada no domicílio da doadora, sendo considerada como uma forma segura e eficaz para a obtenção de LH em maior volume (ARSLANOGLU et al., 2010; BRASIL, 2008; HARTMANN et al., 2007; MENEZES et al., 2014; NICE, 2010). Sendo assim, assegura-se maior cadastramento de doadoras e, conseqüentemente, maior captação de LHD para atender as necessidades das UTIN, proporcionando aos RN prematuros e/ou doentes, além dos cuidados especiais, o LH que garantirá os benefícios tão importantes desse alimento (BICALHO-MANCINI; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2004).

É importante ressaltar que a coleta domiciliar seja feita em um ambiente que não traga risco à qualidade microbiológica e nutricional do leite, devendo, a nutriz seguir as orientações realizadas pela equipe do BLH para limpeza e desinfecção dos utensílios, higienização, extração e armazenamento do LH (BRASIL, 2001; BRASIL, 2008; ARSLANOGLU et al., 2010; MENEZES et al., 2014). O LH coletado no domicílio da doadora é encaminhado ao BLH para o seu processamento sob transporte em cadeia controlada a baixas temperaturas, segundo normas técnicas (HARTMANN et al., 2007; BRASIL, 2008; ARSLANOGLU et al., 2010; NICE, 2010).

Segundo a RBBLH (2018), a doadora deve escolher um frasco de vidro com tampa plástica, lavar com água e sabão, enxaguando bem, em seguida colocar em uma panela o vidro e a tampa e cobrindo com água, deixando ferver por 15 minutos (contado o tempo a partir do início da fervura), após isso, ela deve colocar o frasco e a tampa para secar de boca para baixo em um pano limpo (não enxugar) e usar quando estiver seco. É importante que as doadoras procurem extrair o leite em ambiente tranquilo, confortável, agradável e de preferência privativo, reduzir ou eliminar fontes de dor, desconforto e ansiedade, relaxar estimulando pensamentos e sentimentos agradáveis, evitar interrupções e interferências externas (OLIVEIRA et al., 2006).

A extração do LH pela doadora deve ser realizada após o seu filho amamentar ou quando as mamas estiverem muito cheias. Ao retirar o leite, é importante que siga algumas recomendações que fazem parte da garantia de qualidade do LH distribuído aos bebês hospitalizados, sendo eles: escolher um lugar limpo, tranquilo e longe de animais; prender e cobrir os cabelos com uma touca ou lenço; evitar conversar durante a retirada do leite ou utilizar uma máscara ou fralda cobrindo o nariz e a boca; lavar as mãos e antebraços com água e sabão até os cotovelos, secar em uma toalha limpa; as unhas devem estar limpas e de preferência curtas (MELO, 2005; OLIVEIRA, 2006).

Para realizar a extração do LH, a doadora deve começar fazendo massagem suave com as polpas dos dedos começando na aréola, de forma circular, abrangendo toda mama. Primeiro ela deve colocar os dedos polegar e indicador no local onde começa a aréola, firmar os dedos e empurrar para trás em direção ao corpo, comprimir suavemente um dedo contra o outro, repetindo esse movimento várias vezes até o leite começar a sair, desprezar os primeiros jatos ou gotas (0,5 a 1 mL) e iniciar a coleta no frasco. Durante a ordenha, deve-se evitar puxar ou comprimir o mamilo e fazer movimentos de deslizar ou de esfregar a mama, pois podem lesar a pele e o tecido mamário (BRASIL, 2008; RBBLH, 2018).

Os profissionais do BLH devem explicar à nutriz que nos primeiros minutos o leite não sai, ou sai em pequena quantidade, e que isso ocorre até a liberação do reflexo da ocitocina, que é o hormônio que estimula a descida do leite. Esclarecer também que o tempo de ordenha varia de mãe para mãe, podendo demorar de 15 minutos a mais de uma hora, principalmente nos casos de ingurgitamento mamário severo (BRASIL, 2008; RBBLH, 2018).

O frasco com o LH deve ser armazenado no congelador ou freezer e na próxima vez que for retirar o leite, deve ser utilizado outro recipiente esterilizado, e ao terminar, acrescentar este leite no frasco que está no freezer ou congelador, deixando sempre o volume 2 a 3 cm abaixo da borda, devendo então o leite ficar congelado por até 15 dias, sendo então necessário o encaminhamento ao BLH para realização de seu processamento e distribuição aos RN (BRASIL, 2008; RBBLH, 2018).

3.4 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE HUMANO

O LH apresenta propriedades antimicrobianas que prorrogam a decomposição causada pela microbiota primária, todavia, apresenta pouca eficácia contra os contaminantes secundários provenientes do ambiente, de utensílios e das mães (ALMEIDA, 1999). Torna-se um excelente

meio de cultura para o crescimento de vários microrganismos por ser rico em nutrientes. Assim sendo, deve ser manipulado em condições higiênico-sanitárias adequadas para evitar sua contaminação por patógenos (NOVAK et al., 2008).

Segundo Grazziotin, Grazziotin e Letti (2010), o número de amostras de LH que são descartadas nos BLH ainda é bem alto, possivelmente porque nas etapas de processamento ocorrem erros que favorecem a contaminação microbiológica. As causas de elevação da quantidade de microrganismos no LH podem estar relacionadas com as técnicas inadequadas de coleta, as condições impróprias de higiene da doadora e dos utensílios e a manutenção do leite fora da cadeia de frio durante seu transporte.

Conforme as recomendações técnicas, a extração e o armazenamento do LH devem ser realizados com rigor higiênico-sanitário, para o qual é de extrema importância orientar a doadora sobre a maneira correta de realizar tais procedimentos. No ato da extração domiciliar a doadora deve assumir medidas preventivas, como higiene pessoal e dos utensílios utilizados (BRASIL, 2006; SILVA, 2004).

As normas técnicas enfatizam que todo o LH recebido pelo BLH deve ser sujeito a um severo controle de qualidade, a fim de assegurar sua qualidade nutricional e microbiológica. Constatando que as diretrizes devem ser enfatizadas para que assim seja possível obter um produto com qualidade nutricional e microbiológica a partir do LH extraído no domicílio da doadora (BRASIL, 2008).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria presente na orofaringe dos seres humanos, e sua presença no LH pode traduzir-se como contaminação secundária a partir da pele e fossas nasais, ou devido a condições higiênico-sanitárias insatisfatórias dos utensílios utilizados. A grande preocupação quanto a sua presença recai sobre a ocorrência de cepas que produzem toxinas resistentes à pasteurização, que é realizado pelos BLH (ALMEIDA, NOVAK, SILVA; 1998).

A população de bactérias mesófilas aeróbias inclui a maioria dos contaminantes presentes no LHC, dentre eles os microrganismos patogênicos, e permite uma visão geral a respeito da carga microbiana existente, o que também indica a qualidade higiênico-sanitária e mensura o tempo útil de conservação (SERRA et al., 2013; CHANG; CHEN; LIN, 2012; VIECZOREK, 2010; ROZOLEN et al., 2006; FRANCO, 1996). Em seu estudo com bactérias aeróbicas mesófilas, Serra et al. (2013) compararam a contaminação de amostras de LHC extraídas no domicílio das doadoras e no BLH e observaram maior índice de contaminação nas amostras extraídas em casa comparadas as amostras extraídas no estabelecimento de saúde.

No que diz respeito aos coliformes totais, esse grupo compõe bactérias gram-negativas não esporuladas que fermentam a lactose a 37 °C (TOWNSEND et al. 1998; SENYK et al. 1987). Além disso, apresenta como subgrupo os coliformes termotolerantes que são determinantes eficazes da presença de enterobactérias patogênicas (ALMEIDA et al., 1989). A presença desse grupo no LH, é indício de contaminação, mesmo que indireta, de origem fecal (ALMEIDA et al., 1989).

A exposição dos RN às bactérias patogênicas presentes no LH, como *Streptococos* do grupo B, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, *Proteus*, *Klebsiella pneumoniae* e algumas cepas de *Escherichia coli*, provocam doenças diarreicas, sepse neonatal, meningite e enterocolite necrosante (HAIDEN et al., 2016; KEIM et al., 2013). Além disso, o crescimento de bactérias no leite produz acidificação e fermentação, o que pode levar a diminuição dos componentes nutricionais e imunológicos devido à utilização de nutrientes do leite pela microbiota contaminante (MORAES et al., 2013; GRAZZIOTIN et al., 2010; ABDALLAH et al., 2008; NOVAK; CORDEIRO, 2007; GARLHADO et al., 2002).

O LH acidificado pode não ser capaz de suprir as necessidades nutricionais dos bebês prematuros, especialmente aqueles de baixo peso, pois a acidificação desestabiliza proteínas solúveis e micelas de caseína, favorece a coagulação, aumenta a osmolaridade e altera o *flavor* (sabor e odor). Os carboidratos são convertidos em ácido lático, se ionizando em meio aquoso, liberam prótons (H⁺), causando desestabilidade a caseína e tornando o cálcio e o fósforo indisponível (NOVAK; CORDEIRO, 2007). Dessa forma, quanto maior a produção de ácido lático, menor a biodisponibilidade do cálcio e do fósforo no leite (RBBLH, 2005).

O processamento térmico do LH realizado nos BLH, apesar de causar perdas nutricionais e imunológicas importantes, possui a finalidade de conservar o LH do ponto de vista microbiológico, aumentando sua vida útil. Nesse aspecto, o calor utilizado nesse processo, tem a função principal de eliminar os microrganismos. Ao contrário, a refrigeração e o congelamento, que também são processos de conservação, não têm a finalidade de inativar tais fatores de deterioração e sim inibir o crescimento de microrganismos e a velocidade de reações químicas e enzimáticas (BORGO et al., 2014).

Frazier e Westhoff (1993) consideram que o congelamento pode diminuir o número de microrganismos viáveis existentes no alimento devido aos efeitos letais e subletais que exerce sobre eles, porém não é considerado como um processo de esterilização de alimentos. Isso indica a necessidade da pasteurização, que é definida como o processo capaz de destruir no leite, pelo emprego do calor, a quase totalidade da microbiota deterioradora e a totalidade de

sua microbiota patogênica, procurando alterar o mínimo possível a sua estrutura física e o seu equilíbrio químico.

3.5 VITAMINA A NO LEITE HUMANO

A vitamina A compreende uma família de compostos vitamínicos, encontrada em fontes de origem animal e vegetal, envolvendo retinol e compostos relacionados (retinol, retinal, ácido retinoico, palmitato de retinil) assim como alguns carotenoides (β -caroteno, α -caroteno, α -apo-8'-carotenal, criptoxantina, cantaxantina, astaceno e licopeno), muitos dos quais estão presentes no LH, como retinol e β -caroteno. O seu conteúdo no LH sofre influência do momento da mamada (RIBEIRO; DIMENSTEIN, 2004), do estágio de lactação e alimentação da mãe (MACIAS; SCHUWEIGERT, 2001).

De acordo com o Institute of Medicine (IOM, 2001), a vitamina A atua no metabolismo intermediário, na síntese de ácido ribonucléico (RNA) bem como de proteínas, enzimas, globulinas, glicoproteínas, queratina, na permeabilidade celular e nos metabolismos da hemoglobina e do zinco.

A função da vitamina A está fortemente vinculada ao sistema imunológico e, dentre todos os micronutrientes, é considerada a que está mais intimamente relacionada com a resistência do organismo contra infecções. Dentre suas características, exerce um papel essencial na manutenção da integridade das mucosas, na diferenciação, crescimento e função de neutrófilos, monócitos, células de Langerhans e linfócitos T e B, na expressão de mucina, queratina e citocinas, na produção de imunoglobulina, na participação da hematopoiese e no processo de apoptose (RAMALHO et al., 2003).

A ação antioxidante da vitamina A vem ganhando destaque (RAMALHO et al., 2003; BAYDAS et al., 2002) e está relacionada aos seus precursores carotenoides e retinol, podem ser encontrados como α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína e licopeno (RODRIGUEZ-AMAYA, 2002), sendo o β -caroteno o melhor precursor de retinol (RAMALHO et al., 2003). São considerados como importantes sequestradores de ERO e de radicais peroxil em condições de baixa tensão de oxigênio, sendo distinguidos pela alta capacidade antioxidante (RAMALHO et al., 2003; BAYDAS et al., 2002; PAIVA; RUSSEL, 1998; YEUM et al., 1998; MASCIO et al., 1991). Uma única molécula de retinol ou β -caroteno é capaz de inativar vários radicais livres antes de ser destruída (RAMALHO et al., 2003; BAST et al., 1998). A função antioxidante da vitamina A, e sua relação com o sistema imunológico é

utilizada em um quadro inflamatório devido ao estresse oxidativo que ocorre nessas situações, o que justifica a redução rápida e significativa das concentrações séricas da vitamina durante os processos inflamatórios (ALLIE et al., 2013; ROSS et al., 2003).

Ao longo da gestação, a ingestão e as reservas hepáticas de vitamina A maternas são primordiais para assegurar a transferência placentária desse micronutriente para o feto, configurando a primeira fonte desse nutriente (COELHO; RAMALHO; ACCIOLY, 1995). Ao nascer e durante os primeiros seis meses de vida da criança, as reservas hepáticas de vitamina A estão muito limitadas, em virtude do controle homeostático materno, que regula a transferência placentária da mesma para o feto. A vista disso, o monitoramento e a melhoria do estado nutricional de vitamina A de mulheres no período do puerpério conseguem auxiliar no aumento dos estoques hepáticos e fornecer uma quantidade adequada dessa vitamina as crianças, por meio do consumo do LH, o que permite que a reserva hepática do RN seja elevada, desde que a nutriz disponha de ingestão dietética ou reserva hepática adequada de vitamina A, bem como produção de leite em volume e concentração satisfatórios. Nesta circunstância, a alimentação da criança, desde o seu nascimento e nos primeiros anos de vida, gera efeitos ao longo de toda a vida do indivíduo (ACCIOLY; SAUNDERS; LACERDA, 2012; SOMMER, 1995).

Vale a pena ressaltar que, devido ao fato de ser o alimento mais consumido ao longo do estágio inicial da vida, o LH é considerado a mais relevante fonte de vitamina A para expandir as reservas hepáticas do RN constituindo grande proteção contra deficiência dessa vitamina até os dois anos de idade, período de maior vulnerabilidade de deficiência (OMS, 2013).

Um adequado estado nutricional de vitamina A pode diminuir a severidade dos quadros infecciosos (ATKINSON et al., 1989; ZIEGLER, 1985), enquanto a deficiência pode aumentá-los, devido a prejuízos no sistema imune (ZIEGLER, 1985). Dessa forma, a deficiência de vitamina A (DVA) no LH pode levar a baixas reservas no fígado da criança, promovendo um aumento na sua suscetibilidade a infecções respiratórias graves, pneumonia e diarreia, que contribui para o aumento das taxas de morbidade e mortalidade infantil (OESTE et al., 2002).

Em algumas sociedades tem-se o hábito de desprezar o colostro até o início da secreção do leite maduro, e isso se torna bastante preocupante, pois o RN é privado de receber o LH no momento em que ele é particularmente mais rico em vitamina A, sendo a única fonte dessa vitamina durante o período neonatal para crianças em aleitamento materno exclusivo (ROSS et al., 2003). A capacidade em atingir as necessidades da criança vai depender da concentração e do volume de leite consumido, que são influenciados pelo estado nutricional e ingestão

alimentar da mãe. Crianças que são amamentadas por mulheres que apresentam um adequado estado nutricional dessa vitamina estão protegidas contra sua deficiência (VINUTHA et al., 2000).

O conteúdo no leite é pouco influenciado por um consumo diário inferior a 15 mg pela mãe, porém, quando a ingestão é superior a 15 mg por dia, resulta em acentuada elevação de seu valor (RODRIGUEZ-PALMERO et al., 1999; PEREIRA et al., 1986). A deficiência na nutriz pode levar a transferência inadequada para a criança, perpetuando a deficiência (UNDERWOOD et al., 1994), com manifestações de carência subclínica (ROSS et al., 2003) e sinais clínicos já nos seis primeiros meses de vida (UNDERWOOD et al., 1994), e desenvolvimento de queratomalácia antes do primeiro ano da deficiência (VINUTHA et al., 2000).

A OMS reconheceu, em 2011, que a DVA afeta, em nível mundial, aproximadamente 19 milhões de mulheres grávidas e 190 milhões de crianças em idade pré-escolar, sendo que a maioria está localizada nas regiões da África e Sudoeste da Ásia (OMS, 2011). No Brasil, a DVA já foi considerada como um problema de saúde pública, principalmente na Região Nordeste e em algumas Regiões do Sudeste e Norte. Entretanto, a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher (PNDS-2006) delineou o perfil das crianças menores de 5 anos e das mulheres em idade fértil no Brasil e evidenciou que o problema se encontra em todas as regiões brasileiras. Nessa pesquisa, foi observado que 17,4% das crianças e 12,3% das mulheres apresentavam níveis inadequados de vitamina A. Em crianças, as maiores prevalências foram encontradas nas Regiões Sudeste (21,6%) e Nordeste (19%) do país. A idade materna mais avançada (>35 anos) também foi associada à maior ocorrência de crianças com níveis deficientes de vitamina A. Nas mulheres, as prevalências de deficiência por regiões foram: Sudeste (14%), Centro-Oeste (12,8%), Nordeste (12,1%), Norte (11,2%) e Sul (8%) (BRASIL, 2009).

O MS, por meio da Portaria nº 729, de 13 de maio de 2005, instituiu o Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A, destinado a prevenir e/ou controlar essa deficiência nutricional mediante a suplementação com megadoses de vitamina A, em crianças de 6 a 59 meses de idade e puérperas no pós-parto imediato. A princípio, o programa atendia somente a Região Nordeste, municípios do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, ao Vale do Ribeira em São Paulo, alguns municípios da Amazônia Legal (Região Norte e Estado de Mato Grosso) e alguns Distritos Sanitários Especiais Indígenas, até o primeiro semestre de 2012. A partir do segundo semestre, o programa foi ampliado para todo o país (GRILO et al., 2016).

O MS considera que a deficiência de vitamina A é um problema de saúde pública, particularmente nas regiões e segmentos mais pobres da população do Brasil, com prevalência variando entre 14,6% e 33% em menores de cinco anos. Além disso, considera que esse problema apresenta significativa influência no quadro de morbimortalidade materno-infantil, estando comprovadamente ligado ao surgimento de manifestações oculares e ao comprometimento do sistema imunológico. As puérperas no pós-parto imediato necessitam repor suas reservas corporais e dispor de quantidades suficientes de vitamina A no LH para atender às necessidades da criança amamentada (BRASIL, 2005).

Segundo a OMS, a suplementação profilática de vitamina A deve fazer parte de um conjunto de estratégias para a melhoria da ingestão deste nutriente, portanto, associado à diversificação da dieta, como por exemplo, o incentivo ao aumento do consumo de alimentos enriquecidos com vitamina A, e também dos alimentos fontes da vitamina, especialmente os de origem animal (OMS, 2013; SANTOS; VELARDE; FERREIRA 2010; RAMALHO; SAUNDERS; PADILHA, 2009).

3.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE NO LEITE HUMANO

A CAT reflete a presença e a atividade de componentes que atuam prevenindo e combatendo o estresse oxidativo (TIJERINA-SÁENZ, 2009). Ela tem grande importância para o RN desde o nascimento em que são expostos a condições de estresse oxidativo devido a transição de um meio intrauterino com pouco oxigênio (PO_2 20-25 mmHg) para o meio extrauterino, considerado com condições normais de oxigênio (PO_2 100 mmHg). Este estresse oxidativo, com produção de radicais livres, deve ser controlado por um sistema de defesa antioxidante que é formado durante o decorrer da gestação. Sendo assim, os prematuros podem ter um risco aumentado de danos causados por radicais livres, e os benefícios antioxidantes do aleitamento materno são especialmente importantes para esses bebês (AKDAG et al., 2014; SILVESTRE et al., 2008).

O estresse oxidativo pode ser considerado, em linhas gerais, como um desequilíbrio entre a quantidade de ERO e o sistema de proteção antioxidante, onde ocorre produção excessiva de compostos oxidantes ou baixa remoção desses compostos formados (BARBOSA et al., 2010). Estas ERO são normalmente produzidas nos organismos vivos e seus potenciais resultados prejudiciais incluem danos ao DNA, modificações de proteínas, peroxidação lipídica

e morte celular necrótica ou apoptótica (KOMOSA et al., 2017; SARI et al., 2012; SILVESTRE et al., 2008; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Segundo Scheibmeir et al. (2005) e Thompson et al. (2008), o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de doenças neonatais como displasia bronco pulmonar, retinopatia da prematuridade e enterocolite necrotizante; além de outras patologias como leucoencefalomalácia, hemorragia intraventricular, otite média aguda, gastroenterites, infecções do trato respiratório, dermatite atópica, asma, leucemia infantil, diabetes tipo 2 e obesidade. (LUGONJA, 2013; OVEISI, 2010).

Outro aspecto a ser considerado é que essas ERO produzidas no período fetal ou neonatal estão associadas com as condições que aparecem na vida adulta, como diabetes tipo 2, hipertensão, obesidade e doenças neurodegenerativas, pois provocam variações na estrutura e na função das membranas celulares. Sendo assim, o LH é importante para amenizar o quadro de estresse oxidativo durante o período neonatal e atenuar consequências metabólicas na vida adulta (AKDAG et al., 2014; LEDO et al., 2009; SILVESTRE et al., 2008). O LH contém numerosos constituintes com função antioxidante, sendo eles enzimáticos (catalase, SOD, GPx e coenzima Q10) e não enzimáticos (vitaminas C, E e A e β -caroteno e lactoferrina) (AYCICEK et al., 2006; FRIEL et al., 2002; L'ABBE et al., 2000; LINDMARK-MANSSON; AKESSON, 2000; BUESCHER et al., 1992; GOLDMAN et al., 1990).

O teor de antioxidantes no LH depende de muitos fatores, como a dieta materna, suplementação vitamínica, estado de saúde, estilo de vida, uso de medicamentos, local de residência da mãe, frequência da amamentação pelo bebê e período de lactação (SCHWEIGERT et al., 2004; ALBERTI-FIDANZA et al., 2002; MACIAS et al., 2001; L'ABBE et al., 2000). As concentrações mais elevadas de coenzima Q10 e GPx ocorrem no colostro e diminuem com o avançar da lactação (QUILES et al., 2006; ALBERTI-FIDANZA et al., 2002; ANKRAH et al., 2000). Por outro lado, a atividade da SOD aumenta durante a lactação (L'ABBE et al., 2000).

O estudo de Lugonja et al. (2013), que comparou a CAT do LH e de fórmulas infantis, demonstrou que o LH contém um sistema antioxidante mais poderoso, apresentando níveis mais elevados de SOD e um maior teor de agentes redutores (tióis livres) comparado com fórmulas infantis, o que mostrou que as fórmulas infantis são menos eficazes na eliminação de ERO em comparação com o LH. Outro aspecto a considerar é que a concentração total da enzima SOD no LH é 2 a 2,3 vezes maior do que no leite de vaca (KIYOSAWA; MATUYAMA, 1993; HOLBROOK; HICKS, 1978).

A medida da CAT é uma ferramenta útil na avaliação do papel antioxidante dos compostos investigados. Evidências na área de avaliação da CAT de alimentos para a redução do risco de algumas doenças têm conduzido ao desenvolvimento de métodos para determinar a CAT *in vitro* (PEREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2008).

Para avaliar os níveis de CAT do LH, os métodos mais utilizados são: captura dos radicais livres sintéticos (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico) (ABTS) e (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (DPPH). A captura do radical ABTS pode ser obtido por meio de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Ele é reativo à maioria dos antioxidantes e é solúvel em solventes tanto aquosos como orgânicos, reagindo rapidamente com antioxidantes, podendo ser aplicadas em uma ampla faixa de pH. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

O ensaio do DPPH (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) é um ensaio relativamente simples e rápido sendo um dos ensaios mais utilizados na determinação da CAT. É um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico. Possui um máximo de absorvância a 517 nm, sendo reduzido na presença de antioxidantes, a uma forma incolor. Quanto maior for a concentração e a capacidade antiradicalar de um dado antioxidante, maior será a diminuição na absorvância a 517 nm. Apesar de ser um dos ensaios mais utilizados para a determinação e comparação do estado antioxidante de compostos fenólicos, a avaliação da CAT pelas alterações na absorvância do DPPH, devem ser avaliadas atentamente porque a absorvância do radical DPPH a 517 nm após a reação com um antioxidante diminui com a luz, com o oxigênio e com o tipo de solvente utilizado (KARADAG et al., 2009; LEE et al., 2003).

3.7 INTERFERÊNCIA DO PROCESSAMENTO E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO SOBRE OS COMPOSTOS DO LEITE HUMANO

3.7.1 Efeito da pasteurização sobre os compostos do leite humano

Em BLH, a pasteurização do leite das doadoras é realizada com o objetivo de assegurar a inativação de microrganismos patogênicos e parte dos deteriorantes, eliminando o risco de contaminação dos bebês por agentes infecciosos tais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite B ou citomegalovírus (SILVESTRE et al., 2008).

O método de pasteurização usado nos BLH no Brasil, conhecido como pasteurização lenta, é o de baixa temperatura (62,5° C) por um tempo longo (30 minutos), com imediato resfriamento em banho de gelo até o ponto de frio do LH atingir uma temperatura ≤ 5 °C. Este

tratamento térmico é obrigatório e necessário para a segurança microbiológica, no entanto, pode degradar diversos componentes, como as imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG), lactoferrina, alguns oligoelementos e vitaminas diversas. Pode, ainda, provocar uma diminuição da CAT do leite e inativar completamente a enzima lipase (MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2011).

Segundo o estudo de Silvestre et al. (2008), foi confirmado que o tratamento térmico do LH implica na diminuição de sua ação antioxidante com uma consequente perda de propriedades defensivas. No entanto, foi visto que a pasteurização rápida (75° C por 15 segundos) teve melhores efeitos quando comparado à pasteurização lenta, garantindo menores perdas de compostos antioxidantes, contribuindo assim para manter a qualidade funcional do leite e dos seus benefícios para o lactente. Porém, devido ao seu alto custo operacional não é utilizada nos BLH do Brasil.

O processo térmico provoca alterações nos alimentos de acordo com a intensidade do binômio tempo/temperatura e da sua sensibilidade ao calor, podendo levar a desnaturação de proteínas, inativação de enzimas, oxidação de lipídios, modificação de vitaminas e pigmentos. Dentre os macronutrientes do LH, os lipídios são os que mais sofrem alterações (BORGIO et al., 2014).

Alguns estudos demonstram que o processamento térmico do leite é responsável pela inativação de lipídios bioativos (triglicerídios, diglicerídios, ácidos graxos poli-insaturados e fosfolipídios) que possuem funções anticâncer, antimicrobiana, anti-inflamatória e imunossupressora (GERMAN; DILLARD, 2006; KOENIG et al., 2005). Isso mostra que os lipídios não devem ser vistos apenas como fornecedores de energia, pois devido à sua estrutura e composição podem influenciar não apenas a absorção dos próprios lipídios e das vitaminas lipossolúveis, mas também na absorção, metabolismo e ação de compostos bioativos (GERMAN; DILLARD, 2006).

Lepri et al. (1997), verificaram que o aquecimento do leite a 62,5 °C provocou uma hidrólise parcial dos triglicerídeos e, após 30 minutos (tempo de retenção), houve uma redução significativa nas concentrações dos ácidos graxos mirístico (15%), esteárico (6%), palmítico (8%) e oleico (8%) e a porcentagem de ácidos graxos constituintes dos triglicerídeos não foi alterada, exceto que o linoleico reduziu a sua concentração em 22% após tratamento térmico.

Com relação à vitamina A, alguns estudos demonstraram que o teor de retinol do leite processado diminuiu em relação à amostra não pasteurizada (RIBEIRO et al., 2005; GÓES et al., 2002). O retinol perdido durante o processamento também pode ser devido à exposição

luminosa, uma vez que a vitamina A é fotossensível e o processamento ocorre em ambiente iluminado (SIEBER et al., 1996).

3.7.2 Efeito do congelamento sobre a capacidade antioxidante total do leite humano

Segundo a Academia Americana de Pediatria (2000) em circunstâncias onde a mãe está separada do RN ou quando este é incapaz de sugar ao seio, faz-se necessário o incentivo a extração e o armazenamento do LH. De acordo com o MS (BRASIL, 2015), a nutriz deve esvaziar as mamas, extraindo o seu leite em intervalos regulares e, quando estiver com o lactente, oferecer-lhe o peito para manter a amamentação. O LHC deve ser armazenado sob refrigeração por até 12 horas ou congelado por até 15 dias, em frasco de vidro esterilizado e tampado. Quando o leite for oferecido ao lactente, o frasco deve ser descongelado em banho-maria e o leite ofertado com o auxílio de uma xícara ou colher. Se a mãe for doadora do BLH, ela deve seguir os mesmos procedimentos, congelando em seu domicílio o LH extraído, devendo ser transportado para o BLH no prazo máximo de 15 dias após sua obtenção (BRASIL, 2008).

Akdag et al. (2014) descrevem que o congelamento do LH a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por três meses conservam a sua atividade antioxidante. No entanto, Sari et al. (2012) relatam que o armazenamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dois meses não é uma condição ótima para conservar a CAT do LH. Similarmente, o estudo de Hanna et al. (2004) exibiu que o LH congelado sofre maiores perdas de antioxidantes em comparação ao LH refrigerado, englobando células imunes que são inativadas pelo congelamento. E o armazenamento refrigerado por 48 horas e 7 dias preserva a CAT do LH com maior êxito, quando comparado ao armazenamento congelado por 48 horas e 7 dias, mostrando ainda que quanto maior o tempo de armazenamento, menor a atividade antioxidante.

Marinkovic et al. (2016) relataram não encontrar perdas de antioxidantes significativas no colostro e leite maduro durante o congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 e 30 dias, por avaliação pelo método Oxygen radical absorbance capacity (ORAC). Já Hanna et al. (2004) e Aksu et al. (2014) aplicaram o ensaio ABTS para mostrar que o armazenamento do colostro e leite maduro a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 ou 14 dias provoca uma queda na CAT.

Além do reportado anteriormente, o estudo de Miranda et al. (2004) descreveu que o armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 dias reduz a atividade da glutamina peroxidase e aumenta o teor de malondialdeído, importante biomarcador utilizado na avaliação do estresse oxidativo.

Em contrapartida, Bertino et al. (2013) relataram que o leite armazenado refrigerado por até 96 horas não afeta o seu estado oxidativo, apresentando um nível estável da CAT.

3.7.3 Características das embalagens e efeitos da incidência de luz sobre os compostos do leite humano

Alimentos processados normalmente são acondicionados em embalagens que visam atender às seguintes finalidades: proteger os alimentos de contaminações e/ou perdas; assegurar e facilitar seu transporte; facilitar sua distribuição; identificar o conteúdo, dentre outros (GAVA, 2008).

As embalagens devem apresentar alguns requisitos como: ser atóxica e compatível com o produto; conferir proteção sanitária; proteger contra passagem de umidade, luz, gases, gorduras e aromas; resistir bem a impactos físicos; ter boa aparência; possuir facilidade de abertura e fechamento; ser transparente e opaco de acordo com a necessidade; ter viabilidade econômica, entre outras (GAVA, 2008).

De acordo com a RDC-ANVISA nº. 171, a embalagem para acondicionamento do LH extraído deve ser de vidro, estéril, com boca larga, tampa plástica rosqueável e volume de 50 a 500 mL. Deve apresentar também, fácil limpeza e desinfecção, apresentar vedamento perfeito, e ser constituída de material inerte e inócuo ao leite em temperaturas na faixa de -25 °C a 128 °C, não permitindo trocas indesejáveis com o produto acondicionado e mantendo seu valor biológico (BRASIL, 2006). As embalagens e os materiais que entram em contato com o LH extraído precisam ser resistentes aos processos de esterilização, já que deverão ser esterilizados por métodos apropriados, descritos no manual “Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos” (BRASIL, 2008).

Quanto aos frascos destinados às doadoras, eles têm de ser embalados individualmente para posterior esterilização. A data de validade da esterilização deverá estar registrada no invólucro das embalagens estéreis. As embalagens que apresentarem não-conformidades como manchas, sujidades, rachaduras e trincas, entre outras, devem ser descartadas (BRASIL, 2008).

O vidro, como embalagem, difere dos demais materiais por apresentarem características como: impermeabilidade aos gases, ser totalmente reciclável, o que permite sua reutilização, versatilidade de formatos e cores à embalagem final. Ele apresenta vantagens como: ser inerte, impermeável a gases, umidade, odores e microrganismos, possuir visibilidade do produto, pode ser moldado em vários formatos e cores e ser reciclável. Algumas de suas desvantagens são:

ser mais pesado do que outros materiais de embalagem, elevado índice de quebra, alto risco de ocasionar ferimentos, maiores cuidados na manipulação, pouca resistência a altas temperaturas e choques térmicos (GAVA, 2008). Os vidros transparentes e translúcidos apresentam limitações quanto à barreira à luz e proteção do alimento contra a foto-oxidação (HANLON; KELSEY; FORCINIO, 1998).

O vidro de cor âmbar é obtido pela combinação dos elementos ferro e enxofre em fornos com atmosfera fortemente redutora, obtida usualmente pela adição de compostos contendo carbono. Por apresentar pigmentação escura, essa embalagem apresenta barreira à luz (ALVES et al., 2008).

Outra forma de armazenamento visando à proteção contra a luz é a utilização de papel alumínio para revestimento de embalagens. A folha de alumínio, é uma chapa fina laminada de alumínio puro ou em liga, variando na espessura desde 4,3 μm (0,00017 in) até um máximo de 150 μm (0,0059 in). Por definição da indústria, o alumínio laminado considera-se folha quando atinge uma espessura inferior a 152,4 μm (0,006 in). A folha de alumínio é mundialmente vendida no mercado ao consumidor em rolos de 50 cm de largura e comprimentos variados (ICMS, 2017).

Esse método vem em substituição, de forma mais simples, prática e barata, as embalagens metálicas. O alumínio é um material não ferroso, muito leve, de fácil transformação e apresenta boa resistência à oxidação atmosférica. É utilizado nas mais variadas formas, embalagens rígidas (latas de refrigerante e cerveja), embalagens semirrígidas (formas e bandejas), embalagens flexíveis (sacos e embalagem de salgadinhos) que compõe o plástico ou papel, folha de alumínio para acondicionamento culinário e em embalagem longa vida, que confere barreira à luz (MADI et al., 1984).

As embalagens devem ser selecionadas a fim de alcançar uma melhor estabilidade à oxidação e assegurar uma vida útil adequada ao alimento. Alguns fatores importantes para se obter uma embalagem de maior qualidade é verificar se ela apresenta impermeabilidade ao alimento, impermeabilidade aos gases e proteção contra a luz (PIERGIOVANNI; LIMBO, 2010).

A incidência de luz induz a reações de degradação que proporcionam sérios problemas na qualidade do LH devido ao desenvolvimento de ranço, redução da qualidade nutricional, visto que as vitaminas presentes no leite são fotossensíveis, e se torna um grande problema devido à velocidade nas quais esses fenômenos ocorrem. As embalagens para armazenamento são essenciais para impedir essa deterioração do leite (ABRANCHES et al., 2008). Portanto,

recomenda-se a proteção do leite estocado em frascos de vidro transparente que impeçam a exposição à luminosidade, adotando medidas preventivas, como a simples cobertura dos frascos com papel alumínio (ROMEU-NADAL, 2007; FELLOWS, 2006; SIEBER et al., 1996).

Os nutrientes mais sensíveis a luz UV são vitamina A, carotenos, vitamina B12, vitamina D, ácido fólico, vitamina K, vitamina B2, tocoferóis (vitamina E), triptofano e ácidos graxos insaturados (KOUTCHMA, 2009). Segundo Araújo (2002), a presença de oxigênio, luz UV e calor levam a oxidação lipídica dos triglicerídeos por rancificação oxidativa, ocorrendo na parte da insaturação dos ácidos graxos livres. Essas reações acontecem em cadeia, gerando, posteriormente, compostos desagradáveis formadores do ranço (alcoóis, aldeídos, ácidos e cetonas) que alteram a cor, sabor, odor e características nutricionais originais da matéria-prima.

A sensibilidade de produtos lácteos quando expostos à luz depende principalmente da presença de oxigênio e de riboflavina (vitamina B2), um fotossensibilizador capaz de absorver energia e causar reações de oxidação em cadeia, levando principalmente ao desenvolvimento de sabores/odores estranhos, à perda de nutrientes como vitaminas e aminoácidos e à descoloração de pigmentos (MORTENSEN et al., 2002; BORLE et al., 2001; SKIBSTED, 2000; BOSSET et al., 1995; BRADLEY; MIN, 1992). Um exemplo de sabor estranho desenvolvido pela ação da luz é causado pela oxidação de lipídios insaturados do produto, pela ação do oxigênio singleto (1O_2), formando hidroperóxidos, que são produtos instáveis que formam compostos voláteis (aldeídos, cetonas, ácidos graxos de cadeia curta) que são responsáveis pelo sabor e odor rançoso (SKIBSTED, 2000). O espectro de emissão da fonte luminosa bem como a intensidade e o tempo de exposição podem interferir na intensidade das perdas de qualidade induzidas pela luz em produtos lácteos (BOSSET et al., 1995; BORLE et al., 2001; MORTENSEN et al., 2002).

Como fotossensibilizador, a riboflavina transfere a energia absorvida da luz para outras moléculas, como o oxigênio no produto, que ao receber essa energia, passa de seu estado natural na atmosfera (oxigênio tripleto - 3O_2), para a forma excitada e quimicamente muito reativa (oxigênio singleto - 1O_2). A maioria dos compostos como lipídios, proteínas e açúcares não são capazes de absorver diretamente a luz, porém se tornam sensíveis ao oxigênio singleto. A riboflavina, após induzir a oxidação de substratos sensíveis a ela, pode se reduzir e reagir com o 3O_2 para formar um radical superóxido (O_2^-) (BORLE et al., 2001).

Outra alteração bastante importante que ocorre nos produtos lácteos, causada por reação de fotodegradação, é a perda de vitaminas, ocasionando diminuição do valor nutricional do produto. Também pode ocorrer ativação da vitamina D pela luz UV, que é oxidada pelo

oxigênio singleto. As outras vitaminas importantes, com vitamina E e C, também decrescem seus valores devido suas ações como quelantes de oxigênio singleto (ação antioxidante) (SKIBSTED, 2000).

Alvarez (2009) em seu estudo com leite de vaca relatou que com a exposição do leite de vaca à luz, no caso do varejo, o sabor do leite rapidamente deteriora-se devido à oxidação dos componentes orgânicos, gerando uma variedade de compostos voláteis, tornando-se menos doce e desenvolvendo um sabor de ranço. O estudo demonstra que diversos nutrientes do leite de vaca são afetados por reações de oxidação, incluindo vitaminas (riboflavina, vitamina A), lipídios e proteínas (SCHIFFERSTEIN et al., 2013).

Para que haja a proteção dos compostos orgânicos do leite contra à luz, o mesmo deve ser armazenado sob condições que impeçam sua exposição aos feixes luminosos. O vidro transparente oferece total barreira à luz na faixa do comprimento de onda dos raios ultravioleta até 320 nm. A partir desse comprimento de onda, o vidro transparente apresenta alto percentual de transmissão de luz. Para a obtenção de melhores propriedades de barreira das embalagens de vidro à radiação acima de 320 nm, são, portanto, adicionados pigmentos para conferir coloração ao vidro (ALVES et al., 2008). Os mais utilizados pela indústria de alimentos são os vidros de cor âmbar e verde oliva.

Há fatores como embalagem, processamento térmico, temperatura de transporte e de armazenamento, dentre outros, que podem influenciar o conteúdo nutricional (CHANG et al., 2012; LAWRENCE, 1999; HAMOSH et al., 1996) e as características microbiológicas do LH (NOVAK et al., 2007; CUNHA, 2006).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade microbiológica dos LHC e o efeito das condições de congelamento e incidência de luz sobre os teores de retinol e a CAT *in vitro* do LH destinado aos BLH.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a conformidade dos procedimentos de extração e armazenamento do LH adotados pelas doadoras em domicílio
- Avaliar a qualidade microbiológica do LHC de cada doadora.
- Determinar a CAT do LHC submetido a diferentes tempos e temperaturas de congelamento.
- Avaliar o efeito da incidência de luz pela utilização de três tipos de embalagens (frascos de vidro transparente, âmbar e transparente recoberto por papel alumínio) sobre os teores de retinol e a CAT do LHP.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS DOADORAS

O estudo contou com a participação de 10 doadoras do BLH da Santa Casa de Misericórdia de Ouro Preto, no período de janeiro a abril de 2018. Todas participaram doando LH para todas as etapas do estudo. O recrutamento foi por meio de contato telefônico, após a pesquisa ser aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto, sob o número de CAAE 71251517.9.0000.5150 (ANEXO A). As doadoras que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A). Como critério de exclusão foi adotada idade abaixo de 20 anos.

A caracterização das participantes foi realizada por meio de um questionário estruturado (ANEXO B), para levantamento de dados biológicos, socioeconômicos e demográficos como: idade e escolaridade materna, vínculo empregatício, renda familiar bruta, dados obstétricos e dados da criança. Foi aplicado também um *checklist* de procedimentos para extração do leite (ANEXO C), elaborado pelos profissionais do BLH da Santa Casa de Misericórdia de Ouro Preto, com o intuito de verificar a adequação das nutrizes em relação aos procedimentos de coleta e de armazenamento do LH, os quais são preconizados pelo MS (BRASIL, 2008). É relevante destacar que para não interferir nos procedimentos comumente realizados pelas doadoras no momento da extração, o questionário e o *checklist* foram aplicados no último dia após a coleta do leite.

5.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA

As amostras de LH oriundas das doadoras participantes do estudo, foram analisadas individualmente logo após a extração, e foram avaliadas quanto a contagem de *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e termotolerantes, mesófilos aeróbios totais, fungos e leveduras (BRASIL, 2008). Os resultados foram apresentados, individualmente, em três repetições.

5.2.1 Análises microbiológicas

Foram obtidos aproximadamente 10 mL de LH das 10 doadoras para a realização das análises. Cada uma delas recebeu, em seu domicílio, um frasco de vidro transparente de boca

larga, com tampa plástica rosqueável e capacidade de 100 mL, o qual foi previamente esterilizado. Os membros da equipe do projeto reforçaram as orientações quanto a guardá-lo em local limpo e fechado, livre de insetos e roedores, afastado de substâncias contaminantes e/ou que desprendam odores fortes, devendo retirar a embalagem somente no momento da extração.

Os microrganismos coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus*, mesófilos aeróbios totais e fungos e leveduras foram determinados de acordo com métodos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 62, publicada em 2003 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2003).

A determinação de Coliformes Totais e Termotolerantes, foi realizada pela Técnica do Número Mais Provável (NMP) (MAPA, 2003). Inicialmente, 1 mL das diluições (10^0 , 10^1 e 10^2) foram transferidos para tubos de concentração simples (série de três) contendo 9 mL de Caldo Lauril Sulfato de Sódio (LSTDifco™) com tubos de Durhan invertidos. Procedeu-se incubação a 37 °C por 48 horas e os tubos que apresentaram formação de gás no Caldo LST tiveram alíquotas semeadas em tubos contendo 9 mL de Caldo Verde Brilhante 2% (VB-HiMedia) contendo tubos de Durhan invertidos para o crescimento de coliformes totais. Os tubos foram incubados a 37 °C por 48 horas. Após a confirmação positiva (formação de gás e turvação), realizou-se outro teste para a confirmação de coliformes a 45 °C, sendo transferida uma alçada do Caldo VB para o Caldo Escherichia coli (EC-HiMedia). Os tubos foram incubados a 45 °C em banho-maria por 48 horas. A positividade do teste foi observada pela produção de gás no interior dos tubos de Durhan. Os resultados foram analisados em tabela do Número Mais Provável (NMP).

A determinação de *Staphylococcus aureus*, ocorreu por meio de diluições apropriadas (10^0 , 10^1 e 10^2) do LH, que foram plaqueadas (em superfície) em ágar Baird-Parker (BP) acrescido de gema de ovo a 50%. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, sendo posteriormente, realizada a contagem de colônias negras com halo. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL, considerando o UFC entre 25 e 250 para a sua contagem (SILVA, et. al, 2010)

Mesófilos aeróbios totais e fungos e leveduras foram determinados pelo método de contagem padrão em placas (MAPA, 2003). Diluições apropriadas (10^0 , 10^1 e 10^2) de LH foram plaqueadas (superfície) em ágar PCA (Plate Count Agar) e BDA (Batata Dextrose Agar), respectivamente, para enumeração de mesófilos aeróbios e fungos e leveduras. As placas foram incubadas a 37 °C por 24-48 horas (mesófilos aeróbios) e a 25 °C por 5 dias (fungos e leveduras). Os resultados foram expressos em UFC por mL, considerando o UFC entre 25 e 250 para a contagem de

mesófilos aeróbios totais e entre 10 e 150 para a contagem de fungos e leveduras (SILVA et al., 2010)

No dia do recolhimento dos frascos contendo LH, os mesmos foram transportados até o laboratório de microbiologia da ENUT/UFOP por meio de caixa isotérmica contendo gelo para manter a temperatura máxima de 5 °C, não ultrapassando as 6 horas como orientado pelo manual do BLH (BRASIL, 2008).

5.3 ESTUDO EXPERIMENTAL

5.3.1 1ª Etapa: Avaliação do efeito do tempo e temperaturas de congelamento sobre a capacidade antioxidante do leite humano cru

Foram coletados de cada doadora aproximadamente 10 mL de LH, em frascos de vidro transparentes com tampa rosqueável, sendo a extração realizada por elas próprias e em seus domicílios, seguindo os procedimentos de coleta de acordo com o preconizado pelo manual publicado em 2008 pelo MS, intitulado “Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos” (Ministério da Saúde, 2008).

Após a extração, os leites foram transportados em caixa isotérmica com gelo para manter a temperatura próxima de 0 °C sem ultrapassar 6 horas (BRASIL, 2006), e levados até a Escola de Nutrição (ENUT) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), onde foi conduzida a primeira etapa do estudo experimental.

Ao chegar no laboratório, os leites foram homogeneizados para formar o *pool* destinado ao estudo experimental caracterizado pela avaliação dos efeitos do tempo (2, 4, 9, e 15 dias de congelamento) e das temperaturas (-3° C, -8° C e -18° C) sobre a CAT pelos métodos de captura do radical livre ABTS e pela captura do radical livre DPPH. Portanto, o estudo foi caracterizado por um delineamento fatorial 4 x 3 (4 tempos e 3 temperaturas) mais o tratamento controle (LHC sem congelar), totalizando 13 tratamentos. As amostras de LH congeladas no laboratório, foram descongeladas no momento das análises a temperatura ambiente. Foram realizadas 2 repetições do experimento.

5.3.2 2ª Etapa: Avaliação da interferência da incidência de luz sobre os teores de retinol e capacidade antioxidante total no leite humano pasteurizado

Nessa segunda etapa experimental do estudo foi avaliada a interferência do tipo de embalagem (vidro transparente, vidro âmbar e vidro recoberto por papel alumínio) utilizados nas etapas de coleta, armazenamento e pasteurização do LH, sobre os teores de retinol e CAT. Os três tipos de frascos utilizados para as análises possuíam a mesma espessura e tamanho, tampa rosqueável de polietileno e apresentavam capacidade de 100 mL. As doadoras coletaram em seu domicílio 20 mL de LH em cada um dos três tipos de frascos.

Os leites dos mesmos tipos de frascos foram homogeneizados para formar o pool destinado ao estudo experimental caracterizado pela avaliação da interferência do tipo de embalagem. Após o reenvase nos três tipos de frascos distintos, as amostras de LH foram armazenadas em congelamento com temperatura controlada a -18 °C por 4 dias. Após esse período, os leites foram descongelados e pasteurizados, seguindo os procedimentos preconizados pelo Manual “Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos” (BRASIL, 2008). O descongelamento das amostras de leite foi realizado em banho-maria a 40 °C e a pasteurização a 62,5 °C por 30 minutos após o tempo de pré-aquecimento. Imediatamente após o tratamento térmico, os leites foram resfriados em banho de gelo até que o ponto de frio do leite atingisse uma temperatura inferior a 5 °C. Em seguida, foram realizadas as análises de retinol e CAT. Realizou-se 2 repetições do experimento.

5.4 DETERMINAÇÕES QUÍMICAS

5.4.1 Capacidade antioxidante total

5.4.1.1 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Para medir a capacidade de sequestro do radical livre DPPH foi utilizado o método proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com modificações propostas por Zarban et al. (2009). Foi realizado o preparo da solução controle DPPH a 0,06 mM a partir de 0,0012 g de DPPH com 50 mL de etanol. Realizou-se a leitura da solução controle de DPPH em espectrofotômetro (FEMTO 700 S) com comprimento de onda de 517 nm, sendo o etanol PA utilizado para calibração. Para as determinações, foram utilizados 50 µL de cada amostra de

LH, aos quais foi adicionado 1 mL de DPPH em solução de etanol (0,06 mM). Foi feita homogeneização da mistura que permaneceu em repouso por 30 minutos em banho-maria a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de clorofórmio, sendo centrifugado a 8000 rpm por 5 min. Os resultados são médias de seis replicatas.

A porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculada segundo a seguinte equação:

Atividade sequestradora (%) = [(Absorbância do controle - absorbância da amostra)/Absorbância do controle] * 100.

5.4.1.2 Método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico)

A CAT que equivale ao antioxidante sintético Trolox foi estimada segundo procedimento proposto por Turoli et al. (2004), com algumas modificações. Para a preparação do radical ABTS foi utilizada a reação de 5 mL de solução estoque de ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (40 mM). Essa mistura permaneceu à temperatura ambiente por 16 horas, com ausência de luz. Posteriormente, a solução de ABTS foi diluída em etanol para obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm.

As amostras de LH foram diluídas com tampão fosfato pH 7,4 nas concentrações de 1000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM e 62,5 µM. Em triplicata, pegou-se 20 µL de cada diluição e adicionou-se 2 mL da solução de radical ABTS, sendo homogeneizado e permanecendo em repouso por 10 minutos em abrigo da luz. Em seguida, foram centrifugadas a 8000 rpm durante 5 minutos. Para realização das leituras das absorbâncias foi utilizado o espectrofotômetro (FEMTO 700 S) com comprimento de onda de 734 nm. No cálculo da capacidade antioxidante foi utilizado a curva padrão de Trolox (100, 500, 1000, 1500 e 2000 µM) e suas respectivas porcentagens de inibição. Os resultados do ensaio foram expressos em mmol de equivalente Trolox por litro (mmol ET/L).

5.4.2 Vitamina A (retinol)

Para a extração do retinol das amostras de LH foi utilizado o método proposto por Giuliano et al. (1992) com adaptações. Inicialmente, em uma alíquota de 700 µL de leite foi adicionado 750 µL da solução de etanol HPLC/Butilato Hidroxitolueno (BHT) (0,1%), os quais foram agitados em vórtex durante 10 segundos. Em seguida, foi adicionado 1000 µL de solução de hidróxido de potássio/água 50%, sendo agitado igualmente por 10 segundos. Após

homogeneização, as amostras foram aquecidas em banho-maria a 50 °C por 1 hora, sendo então agitadas a cada 15 minutos para maior efetividade do processo de saponificação. Logo após, foi adicionado 4 mL de hexano/BHT (0,1%), que atua como solvente para o processo de extração. As amostras foram agitadas por 15 segundos e ficaram em repouso por 5 minutos para a recuperação do sobrenadante (2,5 mL). Esse procedimento foi executado por três vezes consecutivas. Um volume de 7,5 mL de sobrenadante foi evaporado utilizando uma atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente. A reconstituição foi feita com 100 µL de etanol HPLC, seguida da etapa de determinação.

As dosagens foram obtidas empregando-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography - HPLC) em detector DAD Shimadzu, varredura de 190 a 800 nm, coluna SunFire C18 3.5 µm, 4.6 x 75 mm (Waters), com comprimento de onda para retinol de 325 nm e fluxo 1 mL/min. de metano/água (95%). Para a determinação foram injetados 20 µL do extrato obtido e o tempo de corrida por amostra foi de 10 minutos.

Para obtenção da curva padrão dopou-se o LH com o padrão all-trans-retinol sintético diluído em etanol grau HPLC nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 15 µg/mL. Essas amostras foram submetidas ao mesmo procedimento de preparo e determinação das amostras. Obteve-se a curva analítica plotando-se concentração de retinol (µmoles de retinol/L) e área sob o pico: equação: $\text{área} = 221080 \times \text{Conc.} + 191124$ e ($R^2 = 0,9958$). Esta curva foi utilizada para o cálculo das concentrações de retinol dos extratos dos leites.

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram aplicados para testar a normalidade dos dados. Na primeira etapa do estudo, devido a distribuição normal dos dados, os resultados do fatorial 4 x 3 (tempos x temperaturas) foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e, devido às interações significativas, procedeu-se o desdobramento das temperaturas estudadas dentro dos tempos utilizando análise de regressão. Na segunda etapa do estudo, em caso de distribuição normal, os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. Para distribuição não normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's. Todas as análises foram realizadas utilizando-se um nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* PRISMA versão 6.01 (2012).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características das doadoras e de seus lactentes estão descritas na Tabela 1. Entre as doadoras participantes do estudo, todas residiam na sede do município de Ouro Preto – MG e estavam na fase de produção de leite maduro. A idade entre as doadoras variou de 21 a 32 anos, com média de 26,6 anos. Em relação à escolaridade, 50% apresentaram ensino médio completo e 20% apresentaram ensino superior completo. No que se refere ao vínculo empregatício, 70% das doadoras estavam inseridas no mercado de trabalho e a faixa de renda mais frequente esteve compreendida entre 1 e 3 salários mínimos (40%). Com relação ao peso ao nascer, 60% nasceram com peso adequado, ou seja, entre 3.000 a 3.9999 g (WHO, 1995) e não houve nenhum nascimento prematuro.

Tabela 1 Caracterização das doadoras e de seus lactentes, Ouro Preto, MG, 2018

Variáveis	n	%
Faixa etária (anos)		
21 – 25	4	40
26 – 30	4	40
31 – 32	2	20
Escolaridade		
Fundamental completo	-	-
Fundamental incompleto	1	10
Médio completo	5	50
Médio incompleto	1	10
Superior completo	2	20
Superior incompleto	1	10
Renda Familiar (salário mínimo)		
≤ 1	3	30
1 a 3	4	40
>3e <5	1	10
>5	1	10
>10	1	10
Possui vínculo empregatício		
Sim	7	70
Não	3	30
Paridade (número de filhos)		
1	6	60
≥2	4	40
Nº de consultas		
≥6 e ≤8	1	10
9	8	80
11	1	10
Tipo de parto		
Cesária	6	60
Normal	4	40
Idade Gestacional		
A termo	10	100
Pré-termo	0	0
Peso ao nascer		
Baixo peso (<2500 g)	0	0
Peso insuficiente (2500 g-2999 g)	3	30
Peso normal (3000 g-3999 g)	6	60
Macrossômico (≥4000 g)	1	10
Total	10	100

*n - número de doadoras

6.1 Qualidade higiênico-sanitária do leite humano

A Tabela 2 apresenta a prevalência de adequação dos itens que compõem o checklist aplicado às doadoras participantes do estudo. Em relação aos cuidados com o frasco coletor, o item com maior frequência de inadequação foi “escolher local reservado, limpo, sem animais por perto, ao extrair o leite” com 40% de adequação.

Os itens referentes aos cuidados com higienização e técnicas de ordenha que apresentaram menor frequência de adequação (10%) foram “evitar a entrada de vento durante a extração” e “prender cabelos, usar máscara ou similar – cobrir nariz e boca”, ao passo que 100% das doadoras afirmaram que “lavam as mãos com bastante sabão e água corrente – secam com toalha limpa”. De acordo com os relatos sobre os cuidados com a pré-estocagem, apesar de 80% delas disserem que, ao terminar a extração, fecham o frasco e congelam imediatamente, apenas 30% disseram não encher o frasco totalmente até a tampa e mantê-los sempre no freezer/congelador por no máximo 15 dias.

Os cuidados com os utensílios e refrigerador apresentaram as menores prevalências de adequação de todas as variáveis estudadas, variando entre 10% a 20%. Somente uma das doadoras afirmou que “faz uso de concha: seguindo os mesmos cuidados da bomba tira leite (não permanecer com leite parado mais que 20 minutos)” e que “verifica a camada de gelo do congelador ($\leq 0,5$ cm)” e duas delas relataram que em relação a “bomba tira leite, adota os procedimentos de lavar com água e sabão, enxaguar e ferver por 15 minutos” e que “não utiliza pano para secá-la, colocando-a em recipiente limpo e fechado”.

Tabela 2 Procedimentos recomendados para extração e coleta de leite humano no domicílio das doadoras, Ouro Preto, MG, 2018

Variáveis	ADEQUAÇÃO (SIM/NÃO)										Prevalência de adequação	
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	n	%
	Cuidados com o frasco coletor	N	N	S	S	S	N	S	S	N	S	6
Coletar o leite nos frascos fornecidos pelo BLH na primeira coleta	N	N	S	S	S	N	S	S	N	S	6	60
Após a primeira coleta usar copo de vidro fervido por 15 minutos												
Deixar o copo escorrer sobre pano limpo até secar	N	N	S	S	S	N	S	S	N	S	6	60
Escolher local reservado, limpo, sem animais por perto, ao extrair leite	N	N	N	S	N	N	S	S	S	N	4	40
Cuidados com higienização e técnicas de ordenha												
O forro da casa é impermeável (alvenaria).	S	N	N	N	S	N	S	N	N	S	4	40
Evitar a entrada de vento durante a extração	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	1	10
Prender cabelos, usar máscara ou similar – cobrir nariz e boca	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	1	10
Lavar mãos com bastante sabão e água corrente - secar c/ toalha limpa	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	10	100
Lavar as mamas apenas com água e secar com toalha limpa	N	S	N	S	S	S	N	S	N	S	6	60
Desprezar os três primeiros jatos de leite extraídos	N	S	N	S	S	S	S	S	S	S	8	80
Esgotar o leite diretamente no frasco estéril vazio	N	N	N	S	S	N	S	S	N	S	5	50
Cuidados com a pré-estocagem												
Ao terminar a extração, fechar o frasco e congelar imediatamente	N	S	N	S	S	S	S	S	S	S	8	80
Na próxima extração usar outro recipiente de vidro estéril	N	S	N	N	S	N	S	S	N	S	5	50
Colocar o leite coletado em cima do leite sob congelamento	N	S	N	S	S	N	S	S	N	S	6	60
Retirar o frasco do congelador e recolocar o leite imediatamente	N	S	N	S	S	N	S	S	N	S	6	60
Não encher o frasco totalmente até a tampa, deixar a 3 cm da borda	N	N	N	S	S	N	S	N	N	N	3	30
Manter os frascos sempre no freezer/congelador por no máx. 15 dias	N	N	N	S	S	N	S	N	N	N	3	30

Cuidados com os utensílios e refrigerador

Bomba tira leite: lavar com água e sabão, enxaguar e ferver por 15 min	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N	2	20
Não secar a bomba com pano, colocá-la em recipiente limpo e fechado	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N	2	20
Uso de concha: seguir os mesmos cuidados da bomba tira leite (não permanecer com leite parado mais que 20 minutos)	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	1	10
Verificar a camada de gelo do congelador ($\leq 0,5$ cm).	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	1	10
Total											10	100

S: SIM; N: NÃO; D1: Doadora 1; D2: Doadora 2; D3: Doadora 3; D4: Doadora 4; D5: Doadora 5; D6: Doadora 6; D7: Doadora 7; D8: Doadora 8; D9: Doadora 9 e D10: Doadora 1

Se tratando da qualidade microbiológica dos leites doados, a contagem de *Staphylococcus aureus* variou entre $<10^2$ e $2,9 \times 10^4$ UFC/mL (Tabela 3), sendo encontrada em todas as amostras de LH coletadas. Segundo o Austrian Ministry of Labour and Social Welfare (1999), a contagem de *Staphylococcus aureus* no LH deve ser $<10^4$ UFC/mL. O LH das doadoras D1, D4 e D9 apresentaram maior contaminação por *Staphylococcus aureus* (Tabela 3) e, analisando suas respectivas respostas no *checklist* (Tabela 2), encontramos que nenhuma das três prendem os cabelos, usam máscara ou similar – cobrindo nariz e boca para a extração. A falta de realização desses procedimentos pode estar associada ao crescimento e desenvolvimento desse microrganismo no LH. Sua presença no LH pode ser interpretada devido à contaminação por uma fonte secundária, como vias nasais, garganta, pele e cabelo, comuns em regiões do corpo humano ou mesmo devido a condições higiênico-sanitárias insatisfatórias dos utensílios empregados em sua manipulação (SILVA et al., 2010). A maior preocupação com relação à sua presença em elevadas concentrações no leite é a ocorrência de cepas que produzem toxinas, chamadas de enterotoxinas, que são resistentes à pasteurização (ALMEIDA et al., 1998), nesse caso, o tratamento térmico elimina o microrganismo, mas não a toxina excretada no leite antes da pasteurização. O quadro clínico observado na intoxicação estafilocócica tem suas características estabelecidas principalmente no vômito e diarreia, sendo que os sintomas clínicos se manifestam após um curto período de incubação (em média 4 horas). Em RN, por apresentarem imaturidade imunológica, principalmente aqueles internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTIN), as enterotoxinas são responsáveis por aumentarem o tempo de hospitalização, a morbidade e a mortalidade (PEREIRA; CUNHA, 2013)

Tabela 3 Resultados das análises microbiológicas de leite humano cru extraído em domicílio.

Doadoras	Repetições	Microrganismos			
		<i>S. aureus</i> *	CT**	CTT**	Mesófilos*
D1	1	2,9 x 10 ⁴	>10 ³	<0,3	1,6 x 10 ⁴
	2	4,9 x 10 ³	<0,3	<0,3	4,3 x 10 ³
	3	1,9 x 10 ⁴	>10 ³	<0,3	>10 ²
D2	1	1,0 x 10 ²	>10 ³	>10 ³	1,7 x 10 ⁴
	2	2,2 x 10 ³	3,6 x 10 ²	>10 ³	2,1 x 10 ³
	3	7,5 x 10 ²	<0,3	<0,3	9,5 x 10 ²
D3	1	7,0 x 10 ²	<0,3	<0,3	9,0 x 10 ²
	2	1,0 x 10 ³	3,6 x 10 ²	2,4 x 10 ⁴	4,7 x 10 ³
	3	7,0 x 10 ²	1,6 x 10 ³	<0,3	1,3 x 10 ³
D4	1	<10 ²	>10 ³	>10 ³	3,7 x 10 ³
	2	1,5 x 10 ²	<0,3	<0,3	1,6 x 10 ³
	3	5,2 x 10 ³	<0,3	<0,3	>10 ²
D5	1	<10 ²	<0,3	<0,3	8,0 x 10 ³
	2	1,0 x 10 ²	<0,3	<0,3	1,1 x 10 ³
	3	1,3 x 10 ³	<0,3	<0,3	>10 ²
D6	1	<10 ²	>10 ³	0,62	3,8 x 10 ³
	2	7,5 x 10 ²	<0,3	<0,3	9,5 x 10 ²
	3	2,5 x 10 ²	<0,3	<0,3	>10 ²
D7	1	<10 ²	<0,3	<0,3	9,0 x 10 ²
	2	1,0 x 10 ²	<0,3	<0,3	0,5 x 10 ²
	3	2,1 x 10 ³	<0,3	<0,3	>10 ²
D8	1	<10 ²	<0,3	<0,3	1,4 x 10 ³
	2	0,5 x 10 ²	<0,3	<0,3	4,6 x 10 ³
	3	1,0 x 10 ³	2,4 x 10 ⁴	<0,3	2,8 x 10 ³
D9	1	<10 ²	2,3 x 10 ¹	<0,92	3,2 x 10 ³
	2	3,4 x 10 ³	<0,3	<0,3	2,4 x 10 ³
	3	3,5 x 10 ²	<0,3	<0,3	>10 ²
D10	1	1,0 x 10 ²	<0,3	<0,3	1,5 x 10 ⁴
	2	2,0 x 10 ²	<0,3	<0,3	0,5 x 10 ²
	3	7,5 x 10 ²	<0,3	<0,3	5,9 x 10 ³

D1: Doadora 1; D2: Doadora 2; D3: Doadora 3; D4: Doadora 4; D5: Doadora 5; D6: Doadora 6; D7: Doadora 7; D8: Doadora 8; D9: Doadora 9 e D10: Doadora 10; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; CT: Coliformes totais; CTT: Coliformes termotolerantes; *UFC/mL; **NMP/mL.

A contaminação dos LH por coliformes totais e termotolerantes variou de <0,3 a >10³ NMP/mL (Tabela 3). O leite das doadoras D2 e D3 obtiveram maior contaminação por coliformes totais e coliformes termotolerantes. Observa-se que as duas doadoras relataram não prender os cabelos, usar máscara ou similar – cobrir nariz e boca. Além disso, elas não se atentam a escolher um local reservado e limpo para fazer a extração (Tabela 2). Dessa forma, esses leites oferecem risco a saúde do RN quando o leite não sofre tratamento térmico (oferecido diretamente

entre mãe e filho), sendo então importante reforçar as orientações sobre os procedimentos higiênico-sanitários adequados para a manipulação do LH, destinado ao próprio filho ou para doação ao BLH, que poderão ser rejeitados no controle de qualidade.

Os coliformes totais apresentam a capacidade de fermentar a lactose à 30 °C, mediante produção de gases, e são representados por mais de 20 espécies, sendo algumas encontradas no trato gastrointestinal de humanos e de animais (ROSA, 2012; MADIGAN et al., 2010). Já os coliformes termotolerantes, caracterizam-se pela capacidade de fermentar a lactose produzindo ácido e gás à temperatura de 45 °C. Os coliformes são destacados como importantes microrganismos indicadores da qualidade microbiológica de leites doados para os BLH (SERAFINI et al., 2006).

Segundo o Manual utilizado pela RBBLH: “Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos” (BRASIL, 2008), é preconizado que a presença de coliformes em amostra de LHC destinados os BLH, não caracteriza o produto como impróprio para consumo, uma vez que, esse grupo de microrganismos é eliminado pelo processo de pasteurização. Nesse caso, mesmo encontrando contaminação nos leites aqui analisados, não implica, necessariamente, em inadequação do leite pelos BLH, pois os mesmos não estão pasteurizados, e passarão por este processo nos BLH, promovendo a inativação dessas bactérias.

Vale a pena ressaltar que os resultados de contaminação encontrados no LHC geram uma preocupação social, pois a maioria das doadoras trabalham fora de casa (70%) e extraem o seu leite para a alimentação de seus filhos enquanto estão ausentes. O leite extraído da mãe para o filho não precisa passar pelo processo de pasteurização, dessa forma, expõe os bebês a contaminações.

O controle de qualidade microbiológica do LHP praticado pelos BLH, que classifica o leite como apto ou inadequado para o consumo, é realizado por meio do teste de coliforme, por ser economicamente viável e seguro, minimizando a possibilidade de resultados falso-negativos (NOVAK; ALMEIDA, 2002).

Sobre os mesófilos aeróbios totais, as contagens variaram de $0,5 \times 10^2$ a $1,7 \times 10^4$ UFC/mL (Tabela 3), sendo que a maioria das doadoras (D1, D4, D5, D6, D7 e D9) apresentaram em pelo menos uma das repetições resultados elevados. De acordo com a RBBLH (2005), quando a extração é realizada em condições higiênico-sanitárias corretas, o LHC apresenta uma contagem total de microrganismos na ordem de 10^2 UFC/mL. Sendo assim, verifica-se que as amostras do nosso estudo apresentaram contaminação acima dos valores considerados seguros, demonstrando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias da extração pelas doadoras,

necessitando o reforço das boas práticas de coleta e manipulação. Serra et al. (2013) encontraram em suas amostras de LH contagem de bactérias mesófilas aeróbias $\geq 10^5$ UFC/mL, acima da maioria dos valores relatados nesse trabalho, demonstrando condições higiênico-sanitárias ainda mais insatisfatórias.

A RBBLH (2005) ressalta que a higienização inadequada dos frascos e de bombas para a retirada de leite contribui com o aumento de até $3,5 \times 10^7$ UFC/mL na contagem total de bactérias e com a contaminação de microrganismos como coliformes. Eles recomendam que além dos cuidados higiênicos pessoais de rotina, a nutriz deve ser orientada a usar o seu próprio leite sobre a região mamilo-areolar depois da extração, pois, o leite posterior é rico em ésteres e ácidos graxos de cadeia curta que exercem função bactericida (RBBLH, 2005). Avaliando os resultados do presente estudo, pode-se verificar que a maioria das amostras analisadas apresentaram valores acima dos considerados seguros, demonstrando, portanto, a necessidade de reforçar as boas práticas de coleta com essas doadoras.

Os resultados do estudo mostraram que as doadoras do BLH da Santa Casa de Misericórdia de Ouro Preto necessitam receber um reforço quanto aos procedimentos domiciliares adequados de extração, acondicionamento e armazenamento do LHC. Cabe aos membros da equipe do presente projeto de pesquisa informar os dados dessa pesquisa a esses profissionais do BLH para eles tomem conhecimento e consciência dos procedimentos inadequados adotados pelas doadoras e poderem tomar as providências cabíveis em cada caso.

6.2 Efeito do tempo e temperaturas de congelamento sobre a capacidade antioxidante total do leite humano

No que diz respeito à interferência do congelamento sobre a CAT do LH determinada pelo método ABTS (Figura 1), verificou-se que houve um aumento significativo ($p \leq 0,05$) da CAT durante o tempo de congelamento (15 dias) nas três temperaturas avaliadas (-3 °C, -8 °C e -18 °C). No entanto, o armazenamento a -3 °C ocasionou maior perda da CAT, seguida da temperatura a -8 °C. Em contrapartida, a -18 °C mantiveram-se os níveis mais altos durante todo o tempo de congelamento, podendo-se inferir que quanto menor a temperatura de congelamento, maior a preservação da CAT do LH.

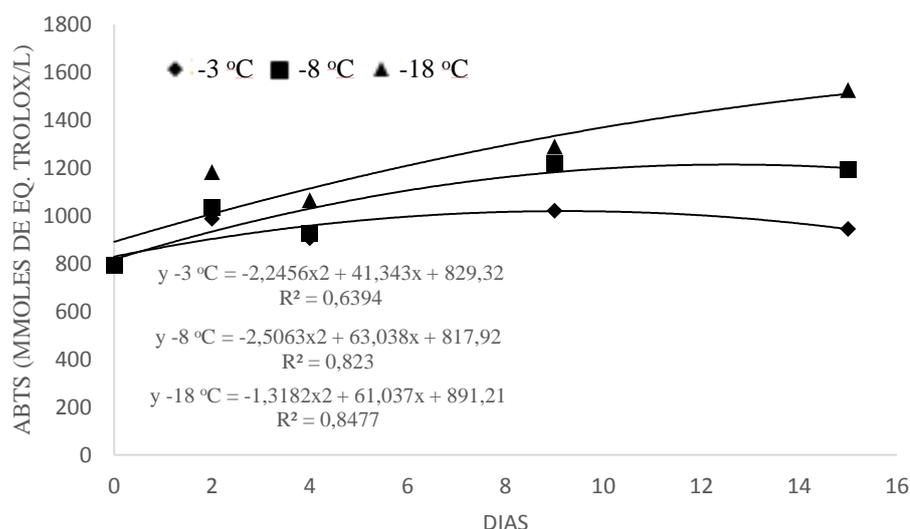


Figura 1 Atividade sequestradora do radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico) do leite humano armazenado em diferentes temperaturas ao longo do tempo de congelamento

O aumento da CAT, observado no presente estudo, pode estar relacionado à formação de cristais de gelo dentro da matriz celular que modificam a permeabilidade das membranas celulares, levando ao dano tecidual pelo congelamento. O efeito desse dano é refletido no descongelamento quando ocorre perda do turgor da célula, devido as membranas celulares danificadas, podendo resultar em aumento da exposição/liberação dos compostos bioativos presentes, como relatado por Alanis-Garza et al. (2015), que observaram um aumento de carotenoides em brócolis submetidos ao congelamento industrial e Oliveira et al. (2008) que verificaram um aumento de flavonoides em couves congeladas.

Segundo Fellows (2006), o que determina a qualidade dos alimentos congelados é o crescimento dos cristais de gelo que leva a danos celulares. Esses são formados por uma proporção de água que sofre mudança do seu estado físico e isto ocorre tanto no congelamento rápido como no lento. Nesse último, praticado no presente estudo, os cristais de gelo formados são maiores e crescem nos espaços intercelulares, rompendo a parede das células adjacentes. Além disto, os cristais de gelo possuem uma pressão de vapor de água menor do que a intracelular, fazendo com que as células se desidratem e sofram um dano permanente devido a maior concentração de solutos e a deformação e colapso da estrutura celular. Já no congelamento rápido, formam-se cristais de gelo menores nos espaços intercelulares e intracelulares, não sendo formados gradientes de pressão de vapor da água, com isso a desidratação das células é mínima

e os danos físicos pequenos. Em congeladores domésticos não há como controlar a velocidade de congelamento e os danos causados ao LH ainda não são bem elucidados.

Outras pesquisas recentes que estudaram o efeito do congelamento sobre a CAT em frutas e vegetais, corroboram com os encontrados neste estudo (GONÇALVES et al., 2017; CAI et al., 2016; PELLEGRINI et al., 2010). Gonçalves et al. (2017) observaram na polpa de morango congelada um aumento da CAT a partir de 4 meses de congelamento, além disso, também encontraram um aumento linear ao longo do tempo de congelamento por ar forçado, enquanto o congelamento por ar estático obteve um comportamento oscilatório com tendência à estabilização a partir do 4º mês. Cai et al. (2016), não só encontraram um aumento da CAT, como também aumentos significativos nos teores de carotenoides e no conteúdo fenólico total, todos em comparação ao brócolis fresco. Da mesma forma, Pellegrini et al. (2010) encontraram aumento significativo da CAT em brócolis congelado comparado ao fresco. No entanto, outras pesquisas obtiveram resultados opostos ao do presente estudo, como o de Hanna et al. (2004) que evidenciou redução da CAT do LH também por meio do método de sequestro do radical livre ABTS, sendo que a perda foi de 19,28% após 7 dias de congelamento a -20 °C. Já Akdag et al. (2014) não acharam diferença significativa na CAT de LH congelados a -80 °C por 3 meses, avaliados também pelo método ABTS, da mesma forma que Lacombe et al. (2012), que ao determinarem a estabilidade de ácidos graxos e tocoferóis durante o congelamento do LH por 30 dias a -20 °C, também não observaram diferença significativa em seus níveis quando comparados ao LH fresco.

Um trabalho de revisão bibliográfica desenvolvido por Sousa, Delgadillo e Saraiva (2016), concluiu que as etapas de processamento do LH adotadas pelos BLH, entre elas o congelamento, substancialmente diminuem seus componentes bioativos. No entanto, vimos que estudos distintos apresentam resultados divergentes e essas diferenças ainda não estão bem esclarecidas. A variabilidade dos resultados encontrados nos estudos pode ser atribuída a diversos fatores como a metodologia utilizada para as análises, manipulação e armazenamento prévio à realização das análises, fase de lactação do leite analisado, região geográfica e etnia das doadoras, tipo de frasco utilizado para o armazenamento do LH, diferença das condições de temperatura e tempo avaliados, bem como a forma de acondicionamento das amostras, que reflete a um ponto de grande importância que é a velocidade de congelamento e formação de cristais de gelo.

Os resultados da determinação da CAT avaliada pelo método de redução do radical livre DPPH demonstraram que ao longo do tempo de armazenamento (15 dias) a CAT do LH reduziu

significativamente ($p \leq 0,05$) em todas as temperaturas de congelamento estudadas ($-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Figura 2). Observou-se, assim como para o ABTS, que quanto menor a temperatura de congelamento, maior a preservação da CAT do LH congelado. Porém, verificou-se que nas três temperaturas houve uma queda significativa até o 9º dia de armazenamento e, após esse tempo, houve uma tendência ligeira em aumentar a CAT.

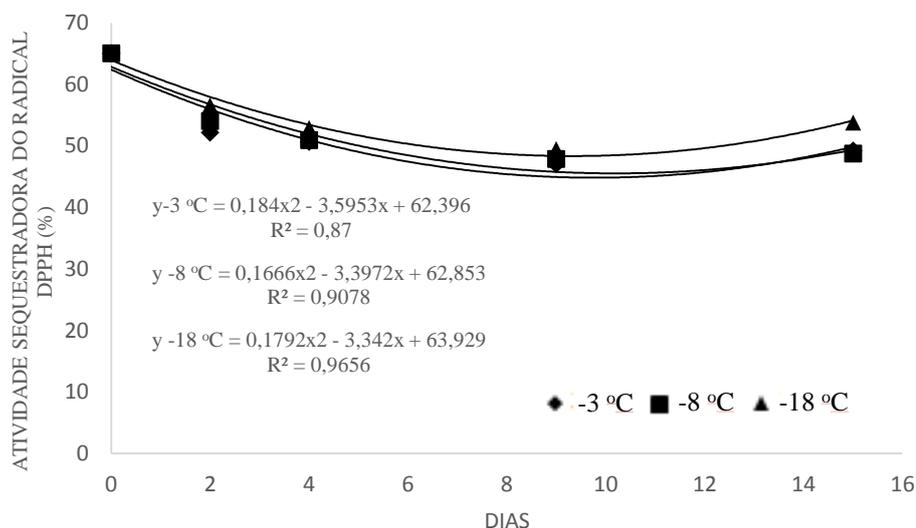


Figura 2 Atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) do leite humano armazenado em diferentes temperaturas ao longo do tempo de congelamento

As diferenças encontradas entre os métodos utilizados para avaliar a CAT (ABTS e DPPH), podem estar relacionados às suas diferenças de especificidades pelos agentes antioxidantes presentes, pois cada método apresenta degradação de certos compostos durante o processo de congelamento e esses compostos podem possuir diferentes graus de afinidade por determinado radical. Segundo Rufino et al. (2010), ao estudarem a CAT de frutas tropicais, observaram uma diversidade de substâncias antioxidantes presentes, sendo que esse complexo pode fornecer respostas diferentes em cada método de determinação da CAT *in vitro*. Isso pode ser explicado considerando que o valor da CAT inclui as atividades de todos os sistemas antioxidantes presentes na amostra de leite (TUROLI et al., 2004). O LH possui sistemas de eliminação de radicais enzimáticos e não enzimáticos (catalase, SOD, GPx, vitaminas A, E, C), e muitas interações podem ocorrer entre diferentes compostos antioxidantes (SHOJI et al., 2004; FRIEL et al., 2002).

Confirmando os resultados encontrados por DPPH, um estudo recente de Paduraru et al. (2018), ao congelar amostras de LH em condições domésticas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}/7$ dias), observaram uma

diminuição significativa ($p \leq 0,05$) de antioxidantes, avaliado pelo método ABTS. Da mesma forma, Xavier et al. (2011) submetendo o LH ao congelamento a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e por 7 dias, observaram redução significativa de CAT ($p \leq 0,0005$) para os dois tempos avaliados pelo método do fosfomolibdênio, sendo que a redução foi maior com maior tempo de armazenamento. Sari et al. (2012), ao congelar o LH a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dois meses observou uma redução significativa ($p \leq 0,05$) da CAT nos leites de transição e maduro, avaliado pelo método de Erel (2004). Silvestre et al. (2010) demonstraram a ocorrência de perdas significativas ($p \leq 0,05$) de GPx do LH congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15, 30 e 60 dias, sendo que tais perdas diferem em intensidade de acordo com a temperatura, sendo menores a temperaturas mais baixas, como constatado no presente estudo.

Outros estudos que utilizaram temperatura próxima a uma das avaliadas nesta pesquisa como o de Aksu et al. (2014), que relataram diminuição pela metade da CAT após 14 dias de congelamento do LH à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Miranda et al. (2004), analisaram a atividade da enzima GPx e o teor do marcador de peroxidação lipídica, malondialdeído (MDA) no LH e evidenciaram que o congelamento do LH a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 dias diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) a atividade da GPx e aumentou o seu teor de MDA, implicando na diminuição da CAT. De acordo com Turoli et al. (2004) o LH armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mantém a enzima lipase lipoprotéica ativa, aumentando a concentração de ácidos graxos livres, e, conseqüentemente, pode levar a produção de ERO, como os peróxidos de lipídeos, que são produtos primários da oxidação lipídica, podendo contribuir com a redução da CAT. Lozano et al. (2014), estudando também a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sobre a CAT do LH, observou uma redução (25%) com 5 dias de congelamento, confirmando os achados desta pesquisa.

A rede brasileira de BLH adota um prazo de 15 dias para a pasteurização do LH após a primeira coleta. Durante este período, permanece grande parte deste tempo armazenado no congelador ou freezer no domicílio das doadoras. Segundo a Embrapa (2016) dentro de uma geladeira doméstica, o congelador atinge temperaturas entre $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em freezers domésticos, as temperaturas estão entre $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essas podem ser bastante variáveis devido ao estado de conservação e a manipulação. Foi possível observar que vários estudos têm fixado temperaturas de congelamento de $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ $^{\circ}\text{C}$, incomuns nos domicílios e BLH, para verificar os efeitos nos compostos bioativos presentes no LH (HANNA et al., 2015; AKDAG et al., 2014; LOZANO et al., 2014; SARI et al., 2012; LACOMBA et al., 2012; SILVESTRE et al., 2010; MIRANDA et al., 2004; TUROLI et al., 2004). O presente estudo avaliou as temperaturas de armazenamento congelado de $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por serem, aqui

no Brasil, mais próximas da realidade dos congeladores e freezers domésticos, onde as mães armazenam o LHC.

Cabe ressaltar ainda que, independentemente dos resultados sobre a estabilidade da CAT no LH durante o armazenamento, a Organização Mundial de Saúde (2010) recomenda a extração e armazenamento do leite da mãe para o seu filho, quando não for possível a amamentação ao peito e também indica o LH do BLH como a melhor opção quando não é possível oferecer o próprio leite da mãe ao seu RN. Hanna et al. (2004) observaram que a CAT de LH é significativamente maior do que a das fórmulas, e esta diferença persiste independente das condições de duração e temperatura de armazenamento avaliadas (-20 °C e 4 °C por 2 e 7 dias).

Os nossos resultados juntamente com os resultados das demais pesquisas, mostram mais uma vez que os estudos relacionados com os efeitos do congelamento sobre a CAT do LH ainda não são conclusivos acerca da melhor condição de armazenamento e, essas divergências, podem estar relacionadas à diversos fatores já mencionados anteriormente.

6.3 Efeito da incidência de luz durante o transporte e processamento sobre a CAT e os teores de retinol do LH

Com relação ao efeito da incidência de luz avaliada por diferentes tipos de embalagens (transparente, transparente recoberto por papel alumínio e âmbar) sobre a CAT determinada pelos métodos ABTS (Figura 3A) e DPPH (Figura 3B), verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os 3 tipos de frascos utilizados.

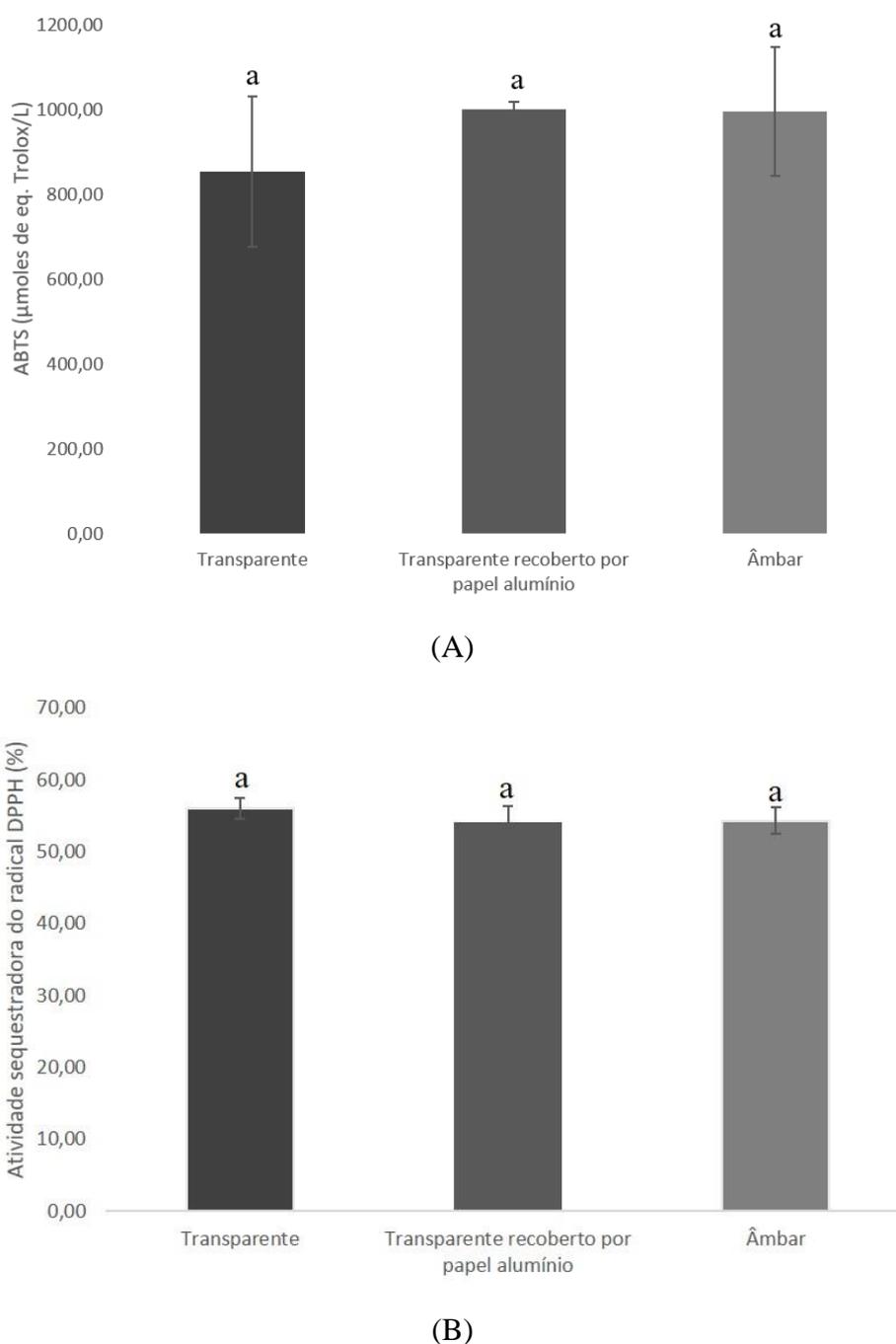


Figura 3 Atividades sequestradoras dos radicais livres ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico) (A) e DPPH ((2,2-difenil-1-picrilhidrazila) do leite humano armazenado em diferentes tipos de embalagens de vidro

Tratamentos seguidos de letras iguais indica que não houve diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey

Contrário aos encontrados no presente estudo, Unal et al. (2017) investigaram o efeito da fototerapia, intervenção comum realizada em UTIN sobre a CAT do LH, uma vez que, a maioria

dos RN de UTIN recebem o leite por meio de sonda orogástrica expostas às luzes de fototerapia por 8 a 12 vezes por dia e verificaram que os níveis de CAT (μmol de eq. Trolox/L) foram menores no grupo de fototerapia quando comparado ao grupo controle (proteção à luz). Dahiya et al. (2006) e Ayyappan et al. (2015) também mostraram que a fototerapia diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) os níveis de antioxidantes não enzimáticos (vitaminas A, C e E, indóis). Em 1988, Smith et al. já haviam demonstrado que a fototerapia diminui a CAT do LH, reduzindo os níveis de vitamina A e C na nutrição parenteral e que o calor gerado pelas luzes também contribui para esse efeito negativo.

Não foi encontrado na literatura internacional e nacional estudos que avaliaram a exposição do LH à luz durante as etapas de extração e de todo o processamento que ele sofre até ser entregue aos lactentes, ou até mesmo estudos que avaliaram diferentes tipos de frascos no armazenamento do LH doado para os BLH. Dessa forma, foi interessante explorar estudos que avaliaram essas questões em outros leites, como Gutierrez et al. (2018) que, ao expor o leite de vaca integral à luz por 4 a 11 dias, encontraram redução dos níveis de CAT comparados aos leites armazenados no escuro, tendo estes apresentado níveis de CAT significativamente ($p \leq 0,05$) maiores do que os tratamentos de leite expostos a luz. Da mesma forma, Smet et al. (2008) encontraram, em seu estudo, diminuição significativa ($p \leq 0,001$) da CAT do leite integral, a partir dos primeiros dias de armazenamento com exposição à luz. Mestdagh et al. (2005) expôs o leite UHT à luz ininterruptamente por 2 meses em três tipos diferentes de embalagens, e a embalagem com barreira completa de luz foi a única que ofereceu proteção suficiente contra reações de oxidação e degradação de vitaminas. Segundo Cakmakci et al. (2005), o leite deve ser armazenado em embalagem à prova de luz e em condições refrigeradas imediatamente após a produção para prevenir a destruição dos compostos sensíveis.

Um fator que deve ser levado em consideração é o tempo curto de exposição à luz em que as amostras do presente estudo foram submetidas, uma vez que elas receberam luminosidade apenas no período de extração, degelo e pasteurização, que não são processos demorados, principalmente ao compararmos com o tempo utilizado nas demais pesquisas mencionadas, onde pode-se observar que utilizaram amplos tempos de exposição das amostras à luz. É importante ressaltar que durante o período de transporte das amostras até o laboratório, elas permaneceram dentro de caixas isotérmicas, protegidas da luz. Da mesma forma, durante o armazenamento até o momento das análises, elas permaneceram no escuro, pela proteção à luminosidade conferida pelo congelador. Portanto, tal fato pode ser responsável pela não alteração significativa da CAT verificado no presente estudo.

No que se refere a interferência do tipo de embalagem nos teores de retinol do LH (Figura 4), não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os frascos âmbar e transparente recoberto por papel alumínio, no entanto, eles diferiram ($p \leq 0,05$) do frasco transparente.

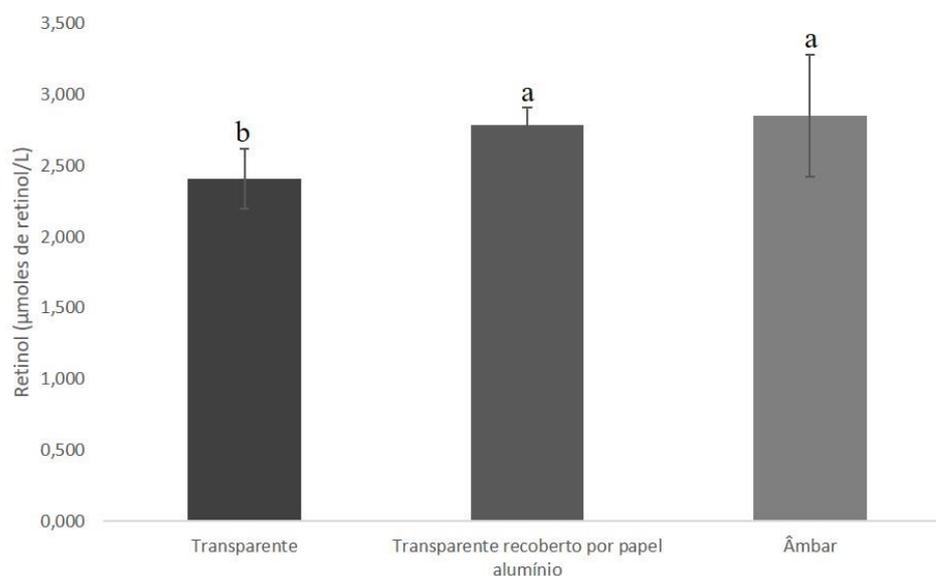


Figura 4 Teores de retinol no leite humano armazenado em diferentes tipos de embalagens de vidro

Tratamentos seguidos de letras diferentes indica diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey

Corroborando com os achados do presente estudo, Saffert et al. (2008) estudando o efeito de diferentes embalagens plásticas de polietileno tereftalato (PET) (transparentes e em alguns níveis de pigmentação) na transmitância de luz fluorescente sobre o conteúdo de vitamina A no leite UHT, reportaram redução nos seus teores no leite armazenado nas embalagens, sendo que quanto maior a pigmentação, menor foi a perda de vitamina A. Dessa forma, os resultados indicam claramente que a garrafa PET pigmentada tem um efeito protetor sobre a vitamina A no leite UHT, pois reduzem a frequência de luz que chegam até os compostos do leite, reduzindo sua degradação.

Guneser e Karagul-Yuceer (2012), estudando o efeito da luz UV sobre os níveis de vitamina A no leite integral, constataram que houve redução significativa ($p \leq 0,05$) da vitamina. Da mesma forma, Whited et al. (2002), observaram, em leites com baixo teor de gordura e desnatado expostos à luz com diferentes intensidades, perdas mensuráveis de vitamina A, após 16 horas de exposição. Senyk e Shipe (1981) também demonstraram uma redução no conteúdo

de vitamina A no leite integral, reduzido em gordura e desnatado expostos à luminosidade por 4 horas.

Brothersen et al. (2016), ao exporem o leite integral a diferentes tipos de luz, encontraram perda de 30% no teor de vitamina A nas primeiras 12 horas de exposição a luz fluorescente, seguida de uma ligeira diminuição. No entanto, não houve perda da vitamina A no leite exposto a luz *Light Emitting Diode* (LED), e para o leite controle, o qual permaneceu na ausência de luz, nenhuma mudança significativa foi encontrada no conteúdo de vitamina A durante 24 horas. Dutra de Oliveira e Marchini (1998), relatam que a vitamina A é relativamente estável sob a ação do calor, mas suscetível ao oxigênio e, principalmente, à luz devido aos efeitos dos raios ultravioleta.

A degradação de vitamina A no leite de vaca devido à exposição à luz também foi investigada em vários outros estudos (ROSE et al., 1990; GAYLORD et al., 1986; DeMAN, 1981). Rose et al. (1990) estudaram a estabilidade da vitamina A do leite desnatado e com baixo teor de gordura armazenados em frascos transparentes comparado aos controles armazenados em frascos protegido da luz com papel alumínio, e então, observaram rápida degradação da vitamina A dos leites contidos nos frascos transparentes ao longo do período de teste de 72 horas. Verificaram também degradação da vitamina A nos controles não expostos à luz, entretanto, a perda foi de aproximadamente metade das amostras expostas. O estudo de Gaylord et al. (1986), em leite integral, com 2% de gordura e desnatado, relatou perdas de 43%, 47% e 55% de vitamina A, respectivamente, após 48 horas de exposição à luz fluorescente. De Man (1981) investigou a perda de vitamina A no leite com 2% de gordura e no leite desnatado exposto à luz fluorescente por 48 horas em temperatura refrigerada e relatou a perda de 32,3%, 23,6% e 95,8% de vitamina A no leite integral, com 2% de gordura e no leite desnatado, respectivamente, após 30 horas de exposição.

A vitamina A é uma forma derivada de carotenóides (principalmente β -caroteno) e é encontrada naturalmente no leite sob a forma de ésteres de retinil. A vitamina A é muito fotossensível no leite, e, quando é exposto à luz, a degradação ocorre por fotoisomerização (MILLER et al., 2007; DeMAN, 1981). Murphy et al. (1988) relataram que vitamina A sofre fotoisomerização na presença de luz, podendo levar à formação de isômeros *cis* com redução de sua atividade. Sabemos que o acondicionamento dos leites doados para os BLH é por meio de frascos de vidro transparentes, portanto, durante a sua extração, processamento e distribuição, sofrem incidência de luz. Dessa forma, os nossos resultados corroboram com dados da literatura, sendo unânimes quanto à redução dos teores de retinol nos diversos tipos de leite.

A redução significativa do retinol pelo frasco transparente é justificada pela alta sensibilidade desse composto à luz, visto em diversos estudos (BROTHERSEN et al., 2016; SAFFERT et al., 2008; GUNESER; KARAGUL-YUCEER, 2012; MILLER et al., 2007; ROSE et al., 1990; GAYLORD et al., 1986; DeMAN, 1981). Uma justificativa plausível para a CAT não ter sofrido redução significativa como o retinol, é o fato de que ela se refere a uma ampla faixa de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que apresentam diferentes graus de sensibilidades à luz, e o conteúdo de retinol da CAT pode ter sido insuficiente devido aos demais antioxidantes presentes, a ponto de influenciar a uma redução significativa dela.

Até onde se sabe, o presente estudo foi pioneiro em avaliar o efeito do tipo de embalagem nos compostos do LH. Sendo assim, houve uma grande dificuldade em encontrar na literatura estudos para respaldar os resultados encontrados, principalmente relacionados com o LH. Portanto, sugere-se que outras pesquisas sejam realizadas para explorar os efeitos da incidência de luz sobre os compostos presentes no LH.

De acordo com todos os resultados encontrados nos experimentos, esse estudo servirá de subsídio para demais pesquisadores ou profissionais ligados ao BLH e até mesmo outros profissionais da saúde conhecerem os reais efeitos das condições de armazenamento do LH, podendo estimulá-los a continuarem as pesquisas a respeito desse tema para que as lacunas ainda existentes sejam sanadas. Dessa forma, o intuito é de que futuramente haja maior conscientização e investimento buscando as melhores formas de alterar as falhas acerca dos procedimentos realizados, levando as menores perdas possíveis de nutrientes do LH processado pelos BLH

7 CONCLUSÃO

Levando em consideração os resultados das análises microbiológicas, verificou-se a presença de todos os microrganismos estudados nos leites de todas as doadoras e, em alguns casos, esse foi acima dos limites seguros. Os resultados do *checklist* mostram que alguns procedimentos higiênico-sanitários necessários não estão sendo realizados de forma criteriosa, sendo importante a adequada orientação das doadoras quanto a esses aspectos higiênico-sanitários.

O congelamento do LH em diferentes tempos e temperaturas influenciou a CAT, evidenciando que em ambos os métodos utilizados quanto menor a temperatura de congelamento maior é a preservação da CAT no LH.

Com relação aos efeitos da incidência de luz pelos diferentes tipos de embalagens sobre os teores de retinol e CAT do LH, conclui-se que a incidência de luz conferida pela utilização do frasco transparente interfere diminuindo os níveis de retinol e que os frascos âmbar e transparente recoberto por papel alumínio dão maior estabilidade ao retinol presente no LH durante as etapas de manipulação e processamento. Já em relação a estabilidade da CAT, observou-se que o tipo de embalagem não interfere na sua estabilidade durante o tempo e condições de exposição à luz avaliados.

8 REFERÊNCIAS

ABDALLAH, V. O. S.; OLIVEIRA, A. M. M.; SILVA, E. R. Qualidade microbiológica do leite humano ordenhado no domicílio: eficácia de uma ação educativa. In: 4ª Semana do Servidor e 5ª Semana Acadêmica, Uberlândia. **Anais eletrônicos**. Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

ABRANCHES, M. V.; DELLA-LUCIA, C. M.; SATORI, M. A.; PINHEIRO SANT'ANA, H. M. Perdas de vitaminas em leite e produtos lácteos e possíveis medidas de controle. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 2, p. 207-17, 2008.

American Academy of Pediatrics. **Committee on Infectious Diseases**. Red Book. 25th ed. Elk Grove Village (IL): AAP; 2000.

AKDAG, A.; SARI, F. N.; DIZDAR, E. A.; URAS, N.; ISIKOGLU, S.; EREL, O.; DILMEN, U. Storage at -80 °C Preserves the Antioxidant Capacity of Preterm Human Milk. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 28, n. 5, p. 415-418, 2014.

AKSU, T.; ATALAY, Y.; TURKYILMAZ, C.; ZLEM GULBAHAR, O.; HIRFANOGLU, I.; DEMIREL, N.; ONAL, E.; ERGENEKON, E.; KOC, E. The effects of breast milk storage and freezing procedure on interleukine-10 levels and total antioxidant activity. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 28, n. 15, p. 1799-802, 2014.

ALANÍS-GARZA, P. A.; BECERRA-MORENO, A.; MORA-NIEVES, J. L.; MORA-MORA, J. P.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. Effect of industrial freezing on the stability of chemopreventive compounds in broccoli. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 66, n. 3, p. 282-288, 2015.

ALBERTI-FIDANZA, A.; BURINI, G.; PERRIELLO, G. Total antioxidant capacity of colostrum, and transitional and mature human milk. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 11, n. 4, p. 275-279, 2002.

ALLIE, S. R.; ZHANG, W.; TSAI, C. Y.; NOELLE, R. J.; USHERWOOD, E. J. Critical role for all-trans retinoic acid for optimal effector and memory effector differentiation of CD8 T cells. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 5, p. 2178-2187, 2013.

ALMEIDA, J. A. G. de et al. **Avaliação da flora microbiana do leite humano ordenhado no IMIP**. 1989.

ALMEIDA, J. A. G. **Amamentação: um híbrido natureza-cultura**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1999

ALMEIDA, J. A. G.; MAIA, P. R. S.; NOVAK F. R. **Os bancos de leite humano como suporte para a redução da mortalidade infantil: a experiência brasileira**. In: Anais do II Congresso Uruguaio de Lactancia Materna, 2004, Montevideo, Uruguay. Acesso em 17 de dezembro de 2017. Disponível em: <http://www.bvsam.cict.fiocruz.br/evcientif/2culm/2culm.htm>.

ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R.; SILVA, I. S. Estudo da ocorrência de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite humano ordenhado. In: **I Congresso Brasileiro de Bancos de Leite Humano**; 8-12 de julho de 1998. Brasília (DF), p. 8-12, 1998.

ALVAREZ, V. B.; S. CLARK, M.; COSTELLO, M.; DRAKE & F. BODYFELT. Fluid milk and cream products. In: **The Sensory Evaluation of Dairy Products**, Springer, New York, p. 73–133, 2009.

ALVES, C. C. de O.; RESENDE, J. V.; CRUVINEL, R. S. R.; PRADO, M. E. T. Estabilidade da microestrutura e do teor de carotenoides de pós obtidos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) liofilizada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 830-839, 2008.

ANDREAS, N.J.; KAMPMANN, B.; MEHRING LE-DOARE, K. Human breast milk: a review on its composition and bioactivity. **Early. Hum. Dev.**, v. 91, n. 11, p. 629-635, 2015.

ANKRAH, N. A.; APPIAH-OPONG, R.; DZOKOTO, C. Human breastmilk storage and the glutathione content. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 46, n. 2, p. 111-113, 2000.

ARAÚJO, R. N. **Degradação do corante azul reativo 19 usando UV; UV/H₂O₂; fenton e foto-fenton. Aplicação em efluentes têxteis**. Dissertação (Mestrado em Saneamento e Meio Ambiente) – Unicamp. Curso de Engenharia Civil, São Paulo, 2002.

ARSLANOGLU, S.; CORPELEIJN, W.; MORO, G.; BRAEGGER, C.; CAMPOY, C.; COLOMB, V.; DECSI, T.; DOMELLOF, M.; FEWTRELL, M.; HOJSAK, I.; MIHATSCH, W.; MOLGAARD, C.; SHAMIR, R.; TURCK, D, VAM GOUDOEVER, J. Donor Human Milk for Preterm Infants: Current Evidence and Research Directions. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 57, n. 4, p. 535-542, 2013.

ARSLANOGLU, S.; BERTINO, E.; TONETTO, P.; DE NISI, G.; AMBRUZZI, A. M.; BIASINI, A.; PROFETI, C.; SPREGHINI, M. R.; MORO, G. E. Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. Italian Association of Human Milk Banks. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 23, n. 2, p.1-20, 2010.

ATKINSON, S. A. Calcium, phosphorus and vitamin D needs of low birthweight infants on various feedings. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v. 78, n. 351, p. 104-8, 1989.

Austrian Ministry of Labour and Social Welfare. [Guidelines for construction and operation of breastmilk banks and other institutions processing expressed human milk]. Vienna: Austrian Ministry of Labour and Social Welfare; p. 1e19, 1999.

AYCICEK, A.; EREL, O.; KOCYIGIT, A.; SELEK, S.; DEMIRKOL, M. R. Breast milk provides better antioxidant power than does formula. **Nutrition**, v. 22, n. 6, p. 616-619, 2006.

AYYAPPAN, S.; PHILIP, S.; BHARATHY, N.; RAMESH, V.; KUMAR, C.N.; SWATHI, S.; KUMAR, A. A. Antioxidant status in neonatal jaundice before and after phototherapy. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 7, n. 1, p. S16-21, 2015.

BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 49–74, 2013.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G. Oxidative stress: Concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629–43, 2010.

BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DER BERG, R. Antioxidant effects of carotenoids. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 68, n. 6, p. 399-403, 1998.

BAYDAS, G.; KARATAS, F.; GURSU, F.; BOZKURT, H. A.; ILHAN, N.; YASAR, A.; CANATAN, H. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 3, p. 276-80, 2002.

BERKOW, S. E.; FREED, L. M.; HAMOSH, M.; et al. Lipases and lipids in human milk: effect of freeze-thawing and storage. **Pediatric Research**, v. 18, n. 12, p. 1257–62, 1984.

BERTINO, E.; ARSLANOGLU, S.; MARTANO, C.; DI NICOLA, P.; GIULIANI, F.; PEILA, C.; CESTER, E.; PIRRA, A.; COSCIA, A.; MORO, G. Biological, nutritional and clinical aspects of the feeding of preterm infants with human milk. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 26, n. 3, p. 9-13, 2012.

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 donated milk in the feeding of preterm infants. **Early Human Development**, v. 89, n. 2, p. 3-6, 2013.

BICALHO-MANCINI, P. G.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Aleitamento materno exclusivo na alta de recém-nascidos internados em berçário de alto risco e os fatores associados a essa prática. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 3, p. 241-248, 2004.

BODE, L.; MCGUIRE, M.; RODRIGUEZ, J.M.; GEDDES, D. T.; HASSIOTOU, F.; HARTMANN, P. E.; MCGUIRE, M.K. It's alive: microbes and cells in human milk and their potential benefits to mother and infant. **Adv. Nutr.**, v. 5, n. 5, p. 571–573, 2014.

BORGO, L. A.; COELHO ARAUJO, W. M.; CONCEICAO, M. H.; SABIONI, R. I.; MENDONCA, M. A. Are fat acids of human milk impacted by pasteurization and freezing? **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, n. 3, p. 1386–1393, 2014.

BORLE, F.; SIEBER, R.; BOSSET, J. O. Photo-oxidation and photoprotection of foods, with particular reference to dairy products. An update of a review article (1993-2000). **Sciences des Aliments**, London, v. 21, n. 6, p. 571-590, 2001.

BOSSET, J. O.; SIEBER, R.; GALLMANN, P. U. Light transmittance: influence on the shelf life of milk and milk products. In: **TECHNICAL guide for the packaging of milk and milk products**. Brussels: IDF – International Dairy Federation, cap. 6, p. 19-39, 1995.

BRADLEY, D. G.; MIN, D. B. Singlet oxidation of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 31, n. 3, p. 211-236, 1992.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 5-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Aprovar o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para Alimentos**.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003**, que oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água, 2003.

BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006. **Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de bancos de leite humano**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 05 de setembro de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos**. Brasília, Brasil: ANVISA, 2008

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro Brasileiro de Análise e Planejamento. **Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher – PNDS 2006: dimensões do processo reprodutivo e da saúde da criança**. Brasília, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 193, de 23 de fevereiro de 2010. **Aprovar a Nota Técnica Conjunta nº 01/2010, que tem por objetivo orientar a instalação de salas de apoio à amamentação em empresas públicas ou privadas e a fiscalização desses ambientes pelas vigilâncias sanitárias locais**. Diário Oficial União. 23 de fevereiro de 2010; Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para crianças menores de 2 anos**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF, Brasil: Ministério da Saúde, 2 ed., 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Condutas Gerais do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A**. Brasília, DF, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Cadernos de Atenção Básica. Saúde da Criança: aleitamento materno e alimentação complementar**. Brasília, DF, Brasil: Ministério da Saúde, 2 ed., 2015.

BRITTO, M. G. M.; BARBOSA, L. L.; HAMANN, E. M. Avaliação Sanitária dos Bancos de Leite Humano na Rede Hospitalar do Distrito Federal. **Revista de Saúde do Distrito Federal**, v. 13, n. 3-4, p.17-28, 2002.

BROTHERSEN, C.; MCMAHON, D. J.; LEGAKO, J.; MARTINI, S. Comparison of milk oxidation by exposure to LED and fluorescent light. **Journal Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2537-44, 2016.

BUESCHER, E. S.; MCILHERAN, S. M. Colostral antioxidants: separation and characterization of two activities in human colostrum. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 14, n. 1, p. 47-56, 1992.

MADI, L. F. C.; CABRAL, A. C. D.; ARDITO, E. de F. G.; SOLER, R. M.; ORTIZ, S. A. Embalagem de alimentos no Brasil. Campinas, SP: ITAL, p. 335, 1984.

CAKMAKCI, S.; TURGUT, T. Influence of different light sources, illumination intensities and storage times on the vitamin C content in pasteurized milk. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 29, p. 1097-1100, 2005.

CALIL, V. L. M. T.; FALCÃO, M. C. Composição do leite humano: o alimento ideal. **Revista de Medicina**, São Paulo, n. 82, p. 1-10, 2003.

CASTELLOTE, C.; CASILLAS, R.; RAMÍREZ-SANTANA, C.; PÉREZ-CANO, F. J.; CASTELL, M.; MORETONES, M. G.; LÓPEZ-SABATER, M. C.; FRANCH, A. Premature delivery influences the immunological composition of colostrums and transitional and mature human milk. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 6, p. 1181-7, 2011.

CHANG, Y.; CHEN, C.; LIN, M. The macronutrients in human milk change after storage in various containers. **Pediatrics & Neonatology**, v. 53, n. 3, p. 205-209. 2012.

CHANTRY, C.; ISRAEL-BALLARD, K.; MOLDOVEANU, Z.; PEERSON, J.; COUTSOUDIS, A.; SIBEKO, L.; ABRAMS, B. Effect of flash-heat treatment on immunoglobulins in breast milk. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 51, n. 3, p. 264–267, 2009.

CONTARINI, G.; POVOLO, M. Phospholipids in milk fat: composition, biological and technological significance, and analytical strategies. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 2, p. 2808–2831, 2013.

CUNHA, M. A. Métodos de detecção de micro-organismos indicadores. **Saúde Ambiente**, v. 1, n. 1, p. 9-13, 2006.

DAHIYA, K.; TIWARI, A. D.; SHANKAR, V.; KHARB, S.; DHANKHAR, R. Antioxidant status in neonatal jaundice before and after phototherapy. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 1, p. 157-60, 2006.

deMAN, J. M. Light-induced destruction of vitamin A in milk. **Journal Dairy Science**, v. 6, p. 2031–2, 1981.

DEMMELMAIR, H.; KOLETZKO, B. Variation of metabolite and hormone contents in human milk. **Clin. Perinatol**, v. 44, n.1, p. 151-164, 2017

DIMENSTEIN, R.; Simplício, J. L.; Ribeiro, K. D. S.; Melo, I. L. P. Influência de variáveis socioeconômicas e de saúde materno-infantil sobre os níveis de retinol no colostro humano. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 6, p. 513-8, 2003.

DONOVAN, S.M.; COMSTOCK, S.S. Human milk oligosaccharides influence neonatal mucosal and systemic immunity. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 69, n. 2, p. 42-51, 2016.

DUGGAN, C.; WATKINS, J.B.; WALKER, W.A. **Nutrition in Pediatrics: Basic Science, Clinical Applications**. 4. ed. Hamilton: BC Decker Inc, 2008.

DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; MACHINI, J. S. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier; 1998.

ESCOBAR, A. M. U.; OGAWA, A. R.; HIRATSUKA, M.; KAWASHITA, M. Y.; TERUYA, P. Y.; GRISI, S.; TOMIKAWA, S. O. Aleitamento materno e condições socioeconômico-

culturais: fatores que levam ao desmame precoce. **Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil**, v. 2, n. 3, p. 253-261, 2002.

EUCLYDES, M.P. **Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação adequada**. 1. ed. UFV, Viçosa; p. 22, 2014.

FELLOWS, P. L. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. Tradução Florencia Cladera Oliveira. 2. ed. Porto Alegre. Artmed, 2006.

FIELD, C. J. The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants. **J. Nutr**, v. 135, n. 1, p. 1-4. 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, Atheneu, p. 181. 1996.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4 ed. Zaragoza: Acribia, p. 681, 1993.

FRIEL, J. K.; MARTIN, S. M.; LANGDON, M.; HERZBERG, G. R.; BUETTNER, G. R. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula, **Pediatric Research Journal**, v. 51, n. 5, p. 612-618, 2002.

GARCIA, C.; DUAN, R. D.; BREVAUT-MALATY, V. GIRE, C.; MILLET, V.; SIMEONI, U.; BERNARD, M.; ARMAND, M. Bioactive compounds in human milk and intestinal health and maturity in preterm newborn: an overview. **Cellular and Molecular Biology**, v. 59, n. 1, p. 108-131, 2013.

GAROFALO, R. Cytokines in human milk. **The Journal of pediatrics**, v. 156, n. 2, p. 36-40, 2010.

GAYLORD, A. M.; WARTHESEN, J. J.; SMITH, D. E. Influence of milk fat, milk solids, and light intensity on the light stability of vitamin A and riboflavin in lowfat milk. **Journal Dairy Science**, v. 69, p. 2779-84, 1986.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.

GERMAN, J. B.; DILLARD, C. J. Composition , structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 1, p. 57-92, 2006.

GIDREWICZ, D.A.; FENTON, T.R. A systematic review and metaanalysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. **BMC Pediatr**, v. 14, n. 1, p. 216, 2014.

GIULIANO, A. R; NEILSON, E. M.; KELLY, B. E.; CANFIELD, L. M. Simultaneous quantitation and separation of carotenoids and retinol in human milk by high-performance liquid chromatography. **Methods in Enzymology**, v. 213, p. 391-9, 1992.

GÓES, H.C.; TORRES, A.G.; DONANGE C.M.; TRUGO, N.M. Nutrient composition of blanked human milk in Brazil and influence of processing on zinc distribution in milk fractions. **Nutrition**, v. 18, n. 7-8, p. 590-4, 2002.

GOLDMAN, A. S.; GOLDBLUM, R. M.; HANSON, L. A. Anti-inflammatory systems in human milk. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 262, p. 69-76, 1990.

GONÇALVES, G. A. S.; RESENDE, N. S.; CARVALHO, E. E. N.; RESENDE, J. V.; VILAS BOAS, E. V. B. Effect of pasteurisation and freezing method on bioactive compounds and antioxidant activity of strawberry pulp. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 68, n. 6, p. 682-94, 2017.

GRANOT, E.; GOLAN, D.; RIVKIN, L.; KOHEN, R. Oxidative stress in healthy breast fed versus formula fed infants. **Nutrition Research**, v. 19, n. 6, p. 869-79, 1999.

GRAZZIOTIN, A. L.; GRAZZIOTIN, M. C. B.; LETTI, L. A. J. Descarte de leite humano doado a Banco de Leite antes e após medidas para reduzir a quantidade de leite imprópria para consumo. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 4, 2010.

GRILO, E. C.; MEDEIROS, W. F.; SILVA, A. G. A.; GURGEL, C. S. S.; RAMALHO, H. M. M.; DIMENSTEIN, R. Maternal supplementation with a megadose of vitamin A reduces colostrum level of α -tocopherol: a randomised controlled trial, v. 29, n. 5, p. 652-662. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, 2016.

GRUMMER-STRAWN, L. M.; MEI, Z. Does breastfeeding protect against pediatric overweight? Analysis of longitudinal data from the Centers for Disease Control and Prevention Pediatric Nutrition Surveillance System. **Pediatrics**, v. 113, n. 2, p. 81-6, 2004.

GUNESER, O.; KARAGUL-YUCEER, Y. Effect of ultraviolet light on water- and fat-soluble vitamins in cow and goat milk. **Journal Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6231-41, 2012.

Gutierrez, A. M.; Boylston, T. D.; Clark, S. Effects of Pro-Oxidants and Antioxidants on the Total Antioxidant Capacity and Lipid Oxidation Products of Milk During Refrigerated Storage. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 2, p. 275-83, 2018.

HALLIWELL, S.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, fourth ed. Oxford University Press, New York, NY, USA, 2007.

HAMOSH, M.; ELLIS L. A.; POLLOCK, D. R.; HENDERSON, T. R.; HAMOSH, P. Breastfeeding and the working mother: effect of time and temperature of short-term storage on proteolysis, lipolysis, and bacterial growth in milk. **Pediatrics**, v. 97, n. 4, p. 492-8, 1996.

HANLON, J. F.; KELSEY, R. J.; FORCINIO, H. E. **Handbook of package engineering**. 3 ed., RC Press. 1998, p. 698. Disponível em: <http://books.google.com/books>. Acesso em: 10 de dezembro de 2017.

HANNA, N.; AHMED, K.; ANWAR, M.; PETROVA, A.; HIATT, M.; HEGYI, T. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 89, n. 6, p. 518–520, 2004.

HARTMANN, B. T.; PANG, W. W.; KEIL, A. D.; HARTMANN, P. E.; SIMMER, K. Best practice guidelines for the operation of a donor human milk bank in a Australian NICU. **Early Human Development**, v. 83, n. 10, p. 667-673, 2007. Disponível em: <http://www.crepreterm.org.au/wp-content/uploads/2014/07/HMB.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2018.

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: current status of knowledge. **Clinical Anatomy**, v. 26, n. 1, p. 29-48, 2012.

HERRMANN, K.; CARROLL, K. An exclusively human milk diet reduces necrotizing enterocolitis. **Breastfeeding Medicine**, v. 9, n. 4, p. 184-190, 2014.

HINRICHSEN, S. L. Biossegurança e Controle de Infecções - Risco Sanitário Hospitalar. **Meds**, v. 1, n. 1, p. 153-7, 2004.

HOLBROOK, J. J.; HICKS, C. L. Variation of superoxide dismutase in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 61, p.1072-1077, 1978.

ICMS. SUBSTITUIÇÃO TRIBUTÁRIA – INAPLICABILIDADE. Orientação da Receita Estadual. **Os produtos descritos como "papel alumínio" e "folhas de alumínio para proteção de fogão a gás"** - MEF30274 - LEST MG, Guarapuava – PR.

INDER, T. E.; VOLPE, J. J. Mechanisms of perinatal brain injury. **Seminars in Neonatology**, v. 5, n. 1, p. 3-16, 2000.

INNIS, S. M. Human milk: maternal dietary lipids and infant development. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66, n. 3, p. 397-404, 2007.

IOM - Institute of Medicine Food and Nutrition Board. **Dietary reference intakes: for vitamin a, vitamin k, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc**. Washington: National Academy Press, p. 773, 2001.

KOMOSA, A.; RZYMSKI, P.; PEREK, B.; ROPACKA-LESIK, M.; LESIAK, M.; SILLER-MATULA, J. M.; PONIEDZIAŁEK, B. Platelets redox balance assessment: current evidence and methodological considerations. **Vascular Pharmacology**, v. 93, n. 95, p. 6-13, 2017.

KHEDR, E. M.; FARGHALY, W. M.; AMRY, SEL. D.; OSMAN, A. A. Neural maturation of breastfed and formula-fed infants. **Acta Paediatrica**. v. 93, n. 6, p. 734-738, 2004.

KIYOSAWA, I.; MATUYAMA, J.; NYUI, S.; YOSHIDA, K. Cu, Zn and Mn- superoxide dismutase concentration in human colostrum and mature milk. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 343-447, 1993.

KOENIG, A.; DINIZ, E. M. A.; BARBOSA, S. F. C.; VAZ, F. A. C. Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization. **Journal of Human Lactation**, v. 21, n. 4, p. 439-443, 2005.

- KOLDOVSKY, O. Hormones in milk. **Vitamins and Hormones**, v. 50, p. 77-86, 1995.
- KOLETZKO, B. Human Milk Lipids. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 69, n. 2, p. 28-40, 2016.
- KOUTCHMA, T. Avanços na tecnologia da Luz Ultravioleta para o Processamento Não-Térmico de Alimentos Líquidos. **Food Bioprocess and Technology**, v. 2, p. 138-155, 2009.
- KUNZ, C.; RODRIGUEZ-PALMERO, M.; KOLETZKO, B.; JENSEN, R. Nutritional and biochemical properties of human milk, part I: general aspects, proteins and carbohydrates. **Clinics in Perinatology**, v. 26, n. 2, p. 307-333, 1999.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-32, 2005.
- L'ABBE, M. R.; FRIEL, J. K. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 31, n. 3, p. 270-274, 2000.
- LACOMBA, R.; CILLA, A.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; SILVESTRE, D.; LAGARDA, M. J. Stability of fatty acids and tocopherols during cold storage of human milk. **International Dairy Journal**, v. 27, n. 1, p. 22-26, 2012.
- LAMOUNIER, J.A.; VIEIRA, G.O.; GOUVEIA, L.C. **Composição do leite humano – fatores nutricionais**. In: Rego, J.D. Aleitamento Materno. 2 ed. Editora Atheneu; p. 55-71, 2009.
- LAWRENCE, R. A. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. **Acta Paediatrica Supplementum**, v. 88, n. 430, p. 14-8, 1999.
- LAWRENCE, R. M.; PANE, C.A. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 37, n. 1, p. 7–36, 2007.
- LEDO, A.; ARDUINI, A.; ASENSI, M. A; SASTRE, J.; ESCRIG, R.; BRUGADA, M.; AGUAR, M.; SAENZ, P.; VENTO, M. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 1, p. 210–215, 2009.

LEPRI, L.; DEL BUBBA, M.; MAGGINI, R.; DONZELLI, G. P.; GALVAN, P. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. **Journal of Chromatography**, v. 704, n. 1-2, p. 1-10, 1997.

LINDMARK-MÅNSSON, H.; AKESSON, B. Antioxidative factors in milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 103-110, 2000.

LOZANO, B.; CASTELLOTE, A.; MONTES, R.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Vitamins, fatty acids, and antioxidant capacity stability during storage of freeze-dried human milk. **Journal of Food Science and Technology**, v. 65, n. 6, p. 703-7, 2014.

LUGONJA, N.; SPASI, S. D. S.; LAUGIER, O.; NIKOLIC-KOKI, A.; SPASOJEVI, I.; ORESCANIN-DUSIC, Z.; VRVIC, M. M. Differences in direct pharmacologic effects and antioxidative properties of mature breast milk and infant formulas. **Nutrition**, v. 29, n. 2, p. 431-435, 2013.

MACIAS, C.; SCHWEIGERT, F. J. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 45, n. 2, p. 82-85, 2001.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. *Microbiologia de Brock*. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010, 818.

MAIA, P. R. S.; ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R.; SILVA, D. A. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano: gênese e evolução. **Revista Brasileira de Saúde Materna Infantil**, v. 6, n. 3, p. 285-292, 2006.

MANZONI, P.; STOLFI, I.; PEDICINO, R.; VAGNARELLI, F.; MOSCA, F.; PUGNI, L.; BOLLANI, L.; POZZI, M.; GOMEZ, K.; TZIALLA, C.; BORGHESI, A.; DECEMBRINO, L.; MOSTERT, M.; LATINO, M. A.; PRIOLO, C.; GALLETTO, P.; GALLO, E.; RIZZOLLO, S.; TAVELLA, E.; LUPARIA, M.; CORONA, G.; BARBERI, I.; TRIDAPALLI, E.; FALDELLA, G.; VETRANO, G.; MEMO, L.; SAIA, O. S.; BORDIGNON, L.; MESSENER, H.; CATTANI, S.; DELLA-CASA, E.; LAFORGIA, N.; QUERCIA, M.; ROMEO, M.; BETTA, P. M.; RINALDI, M.; MAGALDI, R.; MAULE, M.; STRONATI, M.; FARINA, D. Human milk feeding prevents retinopathy of prematurity (ROP) in preterm VLBW neonates. **Early Human Development**, v. 89, n. 1, p. 64-68, 2013.

MARINKOVIC, V.; RANKOVIĆ-JANEVSKI, M.; SPASIĆ, S.; NIKOLIĆ-KOKIĆ, A. LUGONJA, N.; DJUROVIĆ, D.; MILETIĆ, D.; VRVIĆ, M.; SPASOJEVIĆ, I. Antioxidative activity of colostrum and human milk: Effects of pasteurization and storage. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 901-906, 2016.

MARTIN, S., ROE, D.; FAULON J. L. Predicting protein–protein interactions using signature products. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 218–26, 2005.

MASCIO, P.; MURPHY, M. E.; SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 194S-200S, 1991.

MATALOUN, M. M. G. B.; LEONE, C. R. Peculiaridades do metabolismo de cálcio e fósforo no período perinatal: análise crítica da literatura. **Pediatria (São Paulo)**, v. 20, n. 4, p. 332-84, 1998.

MELO, S. L. **Amamentação: contínuo aprendizado**. Belo Horizonte: Coopmed, 2005

MENEZES, G. Cavalcanti, L. L.; Oliveira, A. M. M.; Pinto, R. M. C.; Abdallah, V. O. S. Evaluación de la recolección domiciliar realizada por un banco de leche humana de un hospital universitario de Brasil. **Salud Pública de México**, v. 56, n. 3, p. 245-250, maio/jun., 2014. Disponível em: <<http://www.scielosp.org/pdf/spm/v56n3/v56n3a9.pdf>>. Acesso em: 28 mai. 2018.

MENON, G.; WILLIAMS, T. C. Human milk for preterm infants: why, what, when and how? **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v. 98, n. 6, p. F559-F56, 2013.

MESTDAGH, F.; DE MEULENAER, B.; DE CLIPPELEER, J.; DEVLIEGHERE, F.; HUYGHEBAERT, A. Protective influence of several packaging materials on light oxidation of milk. **J. Dairy. Sci.**, v. 88, n. 2, p. 499-510, 2005.

MESTDAGH, F.; DE MEULENAER', B.; DE CLIPPELEER, J.; DEVLIEGHERE, F.; HUYGHEBAERT, A. Protective Influence of Several Packaging Materials on Light Oxidation of Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 499-510, 2005.

MILLER, D. G.; JARVIS, J. K.; MCBEAN, L. D. **Handbook of Dairy Food and Nutrition**. 3rd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2007.

MIRANDA, M.; MURIACH, M.; ALMANSA, I.; JARENÓ, E.; BOSCH-MORELL, F.; ROMERO, F. J.; SILVESTRE, D. Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. **Biofactors**, v. 20, n. 3, p.129–37, 2004.

MOLTÓ-PUIGMARTÍ, C.; PERMANYER, M.; CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZSABATER, M.C. Effects of pasteurization and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 697–702, 2011.

MORAES, P. S.; OLIVEIRA, M. M. B.; DALMAS, J. C. Perfil calórico do leite pasteurizado no banco de leite humano de um hospital escola. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 31, n. 1, p. 46-50, 2013.

MORTENSEN, G.; STAPELFELDT, H.; SORENSEN, J. Reduction of photo-oxidative quality changes in cheeses by proper packaging. In: IAPRI CONFERENCE ON PACKAGING, 13, 2002, East Lansing. **Proceedings of the 13 IAPRI Conference on Packaging**. Boca Raton: CRC Press, v. 1, n. 1, p. 531-540, 2002.

MURPHY, P. A.; ENGELHARDT, R.; SMITH, S. E. Isomerization of retinyl palmitate in fortified skim milk under retail fluorescent lighting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 592-5, 1988.

MUSILOVA, S.; RADA, V.; VLKOVA, E.; BUNESOVA, V. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. **Beneficial Microbes**, v. 5, n. 3, p. 273-283, 2014.

NAGASAWA, T.; KIYOSAWA, I.; FUKUWATARI, Y.; KITAYAMA, T.; UECHI, M. Alpha-lactalbumin and serum albumin in human milk. **Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 2, p. 177-88, 1973.

NAGEL, E.; VILSENDOR, A. M.; BARTELS, M.; PICHLMAYR, R. Antioxidative vitamins in prevention of ischemia/reperfusion injury. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 298-306, 1997.

NASCIMENTO, M. B. R.; ISSLER, H. Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 58, n. 1, p. 49-60, 2003.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE (NICE). Donor breast milk banks: the operation of donor breast milk bank services. London: **National Institute for Health and Clinical Excellence**, 2010.

NOVAK, F. R, CORDEIRO, D. M. B. Correlação de população de microorganismos mesófilos aeróbios e acidez Dornic no leite humano ordenhado. **Journal of Pediatrics**, v. 83, n. 1, p. 87-91, 2007.

NOVAK, F. R.; JUNQUEIRA, A. R.; DIAS, M. S. P. C.; ALMEIDA, J. A. G. Sensorial analysis of expressed human milk and its microbial load. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 2, p. 181-4, 2008.

NOVAK, F. R.; ALMEDA, J. A. G.; ASENSI, M. D.; MORAES, B. A.; RODRIGUES, D. P. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de ordenação humana ordenada. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, n. 3, p.713-7, 2001.

O'CONNOR, D. L.; EWASCHUK, J. B.; UNGER, S. Human milk for pasteurization: Benefits and risks. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 18, n. 3, p. 269-275, 2015.

OESTE, J. K.; KATZ, J.; NATAN, G. C. Physiological indicators of vitamin A status. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 9, p. 2889-2894, 2002.

OLIVERA, D. F.; VINA, S. Z.; MARANI, C. M.; FERREYRA, R. M.; MUGRIDGE, A.; CHAVES, A. R.; MASCHERONI, R. H. Effect of blanching on the quality of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. gemmifera DC) after frozen storage. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p. 148-155, 2008.

OLIVEIRA, M. I. C. et al. **Manual de capacitação de multiplicadores: Iniciativa Unidade Básica Amiga da Amamentação**. Rio de Janeiro: Secretaria de Estado de Saúde, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Directriz: administración de suplementos de vitamina A a lactantes y niños 6–59 meses de edad.** Ginebra, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Recomendações sobre pós-natal Cuidados da mãe e recém-nascido.** Genebra, Suíça: WHO Press; 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Saúde da Criança. Aleitamento Materno e Alimentação Complementar.** 2ª edição. Cadernos de Atenção Básica, nº 23. Brasília, DF, 2015.

OVEISI, M. R.; SADEGHI, N.; JANNAT, B.; HAJIMAHMOODI, M.; BEHFAR, A. O.; JANNAT, F.; MOKHTARINASAB, F. Breast milk provides better antioxidant capacity than infant formula. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 445-449, 2010.

OWEN, A. M.; COLEMAN, M. R.; BOLY, M.; DAVIS, M. H; LAUREYS, S.; PICKARD, J. D. Detecting awareness in the vegetative state. **Science**, v. 313, n. 5792, p. 1402, 2006.

PADUA, F. S. Qualidade, segurança microbiológica e enumeração da microbiota láctica autóctone do leite de cabra produzido na região centro-oeste. 2013, 58:42 Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2013.

PAIVA, S. A. R.; RUSSEL, R. M. b-caroteno and others carotenoids as antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 426-33, 1999.

PĂDURARU, L.; DIMITRIU, D. C.; AVASILOAIEI, A. L.; MOSCALU, M.; ZONDA, G. I.; STAMATIN, M. Total antioxidant status in fresh and stored human milk from mothers of term and preterm neonates. **Pediatrics & Neonatology**, v. 59, n. 1, 2018.

PAPP, A.; NEMETH, I.; KARG, E.; PAPP, E. Glutathione status in retinopathy of prematurity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, v. 7-8, p. 738-43, 1999.

PENTEADO, M.D. 1. ed. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos.** Barueri: Manole, p. 25, 2003.

PELLEGRINI, N.; CHIAVARO, E.; GARDANA, C.; MAZZEO, T.; CONTINO, D.; GALLO, M.; RISO, P.; FOGLIANO, V.; PORRINI M. Effect of different cooking methods on color,

phytochemical concentration, and antioxidant capacity of raw and frozen brassica vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4310-21, 2010.

PEREIRA, G. R.; BARBOSA, N. M. M. Controversies in neonatal nutrition. **Pediatric Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 65-89, 1986.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; SANTOS, E. J.; SELLOS, I. T.; BERGDOLL, M. S. Staphylococci in breast milk from women with and without mastitis. **Microbiological Reviews**, v. 26, p. 117-20, 1995.

PEREIRA, V. C.; CUNHA, M. L. R. S. **Coagulase-negative staphylococci strains resistant to oxacillin isolated from neonatal blood cultures**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 939-942, 2013.

PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n.185, p. 185-191, 2008.

PICCIANO, M. F. Nutrient composition of human milk. **Pediatric Clinics of North America**, v. 48, n. 1, p. 53-67, 2001.

PIERGIOVANNI, L.; LIMBO, S. Packaging and the Shelf Life of Vegetable Oils In: Robertson, G. L. **Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide**, CRC Press, Boca Raton, p. 318, 2010.

POWE, C. E.; KNOTT, C. D.; CONKLIN-BRITTAIN, N. Infant sex predicts breast milk energy content. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 1, p. 50–4, 2010.

QUIGLEY, M.; MCGUIRE, W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 22, n. 4, 2014.

QUILES, J. L.; OCHOA, J. J.; RAMIREZ-TORTOSA, M. C.; LINDE, J.; BOMPADRE, S.; BATTINO, M.; NARBONA, E.; MALDONADO, J.; MATAIX, J. Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. **Free Radical Research**, v. 40, n. 2, p. 199-206, 2006.

RAMALHO, R. A.; ACCIOLY, E.; SILVA, L. M. Cardiovascular diseases: anti-oxidant effect of vitamins A, C and E. **Nutrition & Metabolism**, v. 7, p. 6-9, 2003.

RAMÍREZ-SANTANA, C.; PÉREZ-CANO, F. J.; AUDÍ, C.; CASTELL, M.; MORETONES, M. G.; LÓPEZ-SABATER, M. C.; CASTELLOTE, C & FRANCH, A. Effects of cooling and freezing storage on the stability of bioactive factors in human colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2319-2325, 2012.

REDE BLH. Rede Brasileira de Banco de Leite Humano. **Bancos de Leite Humano no Tempo**, 2018. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=79>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2017.

RBBLH. Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano. **Determinação de acidez titulável - método Dornic. BLH-IFFNT**. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br/media/seleclas.pdf>. Acesso em 25/02/2017.

RIBEIRO, K. D.; DIMENSTEIN, R. Foremilk and hindmilk retinol levels. **PAHO Pan American Journal of Public Health**, v. 16, n. 1, p. 19-22, 2004.

RIBEIRO, K. D. S.; MELO, I. L. P.; PRISTO, A. Z. O.; DIMENSTEIN, R. The effect of processing on the vitamin A content of human milk. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 1, p. 61-4, 2005.

RIORDAN, J.; AUERBACH, K.G. **Breastfeeding and human lactation**. 2. ed. Burlington: Jones and Bartlett Publishers, p. 61-121, 1999.

RISKIN, A.; ALMOG, M.; PERI, R.; HALASZ, K.; SRUGO, I.; KESSEL, A. Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. **Pediatric Research**, v. 71, n. 2, p. 220-225, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington: International Life Sciences Institute, p. 64, 2001.

RODRIGUEZ-PALMERO, M.; KOLETZKO, B.; KUNZ, C.; JENSEN, R. Nutritional and biochemical properties of human milk: II. Lipids, micronutrients and bioactive factors. **Clinics in Perinatology**, v. 26, n. 2, p. 335-359, 1999.

ROMEU-NADAL, M.; CASTELLOTE, A. I.; GAYA, A.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Effect of pasteurisation on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, 434-438, 2007.

ROSA LS; QUEIROZ MI. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 422-430, 2007.

ROSS, J. S.; HARVEY, P. W. Contribution of breastfeeding to vitamin A nutrition of infants: a simulation model. **Bulletin World Health Organization**, v. 81, n. 2, p. 80-86, 2003.

ROZOLEN, C. D.; GOULART, A. L.; KOPELMAN, B. I. Is breast milk collected at home suitable for raw consumption by neonates in Brazilian public neonatal intensive care units?. **Journal of human lactation: official journal of International Lactation Consultant Association**, v. 22, n. 4, p. 418, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SAARELA, T.; KOKKONEN, J.; KOIVISTO, M. Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation, **Acta Paediatrica**, v. 94, n. 9, p. 1176-81, 2005.

SAFFERT, A.; PIEPER, G.; JETTEN, J. Effect of package light transmittance on vitamin content of milk. Part 2: UHT whole milk. **Packaging Technology and Science**, v. 21, p. 47-55, 2008.

SARI, F. N.; AKDAG, A.; DIZDAR, E. A.; URAS, N.; ERDEVE, O.; EREL, O.; DILMEN, U. Antioxidant capacity of fresh and stored breast milk: is $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ optimal temperature for freeze storage? **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 25, n. 6, p. 777-782, 2012.

SCHANLER, R. J. Suitability of human milk for the low-birthweight infant. **Clinics in Perinatology**, v. 22, n. 2, p. 207-22, 1995.

SCHIFFERSTEIN, R.; FENKO, A.; DESMET, P.; MARTIN, N. Influence of package design on the dynamics of multisensory and emotional food experience. **Food Quality and Preference**, v. 27, n. 1, p. 18-25, 2013.

SCHEIBMEIR, H. D.; CHRISTENSEN, K.; WHITAKER, S. H.; JEGAETHESAN, J.; CLANCY, R.; PIERCE, J. D. **Intensive Critical Care Nursing**, v. 21, n. 1, p. 18-25, 2005.

SCHWEIGERT, F. J.; BATHE, K.; CHEN, F.; BÜSCHER, U.; DUDENHAUSEN, J. W. Effect of the stage of lactation in humans on carotenoid levels in milk, blood plasma and plasma lipoprotein fractions. **European Journal of Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 39-44, 2004.

SENYK, G. F. KOZLOWSKI, S. M.; NOAR, P. S.; SHIPE, W. F.; BANDLER, D. K. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 6, p. 1152-1158, 1987.

SENYK, G. F.; SHIPE, W. F. Protecting your milk from nutrient losses. **Dairy Field**, v. 164, p. 81-85, 1981.

SERAFINI, A. B.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; RODRIGUES, M. A. V.; KIPNIS, A.; CARVALHO, C. O.; CAMPOS, M. R. H.; MONTEIRO, E. C.; MARTINS, F.; JUBÉ, T, F, N. Microbiological quality of human milk from a Brazilian milk bank. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 775-9, 2003.

SERRA, V. V.; TEVES, S.; LÓPEZ DE VOLDER, A.; OSSORIO, F.; AGUILAR, N.; ARMADANS, M. Comparison of the risk of microbiological contamination between samples of breast milk obtained at home and at a healthcare facility. **Archivos Argentinos De Pediatría**, v. 111, n. 2, p. 115-119, 2013.

SHOJI, H.; SHIMIZU, T.; SHINOHARA, K, OGUCHI, S.; SHIGA S.; YAMASHIRO, Y. Suppressive effects of breast milk on oxidative DNA damage in very low birthweight infants. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 89, n. 2, p. F136-F138, 2004.

SIEBER, R. et al. Effect of microwave heating on vitamins A, E, B1, B2 and B6 in milk. **Journal of Dairy Research**, v. 63, n. 1, p.169-172, 1996.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4ª Ed-São Paulo: Livraria Varela, p 59-64, 2010.

SILVESTRE, D.; MIRANDA, M.; MURIACH, M.; ALMANSA, I.; JAREÑO, E.; ROMERO, F. J. Frozen Breast Milk at -20°C and -80°C : A Longitudinal Study of Glutathione Peroxidase Activity and Malondialdehyde Concentration. **Journal of Human Lactation**, v. 26, n. 1, p. 35-41, 2010.

SILVESTRE, D.; MIRANDA, M.; MURIACH, M.; ALMANSA, I.; JARENO, E.; ROMERO, F. J. Antioxidant capacity of human milk: Effect of thermal conditions for pasteurization. **Acta Paediatrica**, v. 97, n. 8, p. 1070-1074, 2008.

SKIBSTED, L. H. Light-induced changes in dairy products – Packaging of milk products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 346, p. 4-9, 2000.

SMET, K.; RAES, K.; DE BLOCK, J.; HERMAN, L.; DEWETTINCK, K.; COUDIJZERA, K. A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 520-30, 2008.

SMITH, J. L.; CANHAM, J. E.; WELLS, P. A. Effect of phototherapy light, sodium bisulfite, and pH on vitamin stability in total parenteral nutrition admixtures. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 394-402, 1988.

SOUSA, S. G.; DELGADILLO, I.; SARAIVA, J. A. Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. **Food Chemistry**, v. 151, p. 79–85, 2014.

SOUSA, S. G.; DELGADILLO, I.; SARAIVA, J. A. Human Milk Composition and Preservation: Evaluation of High-pressure Processing as a Nonthermal Pasteurization Technology. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 6, p. 1043-60, 2016.

THOMAS, E. L. Trends in milk flavors. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 6, p. 1023–1027, 1981.

THOMPSON, D. M.; LU, C.; GREEN, P. J.; PARKER, R. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. **RNA**, v. 14, n. 10, p. 2095-103, 2008.

TIJERINA-SÁENZ, A.; INNIS, S. M.; KITTS, D. D. Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and E and fatty acid composition. **Acta Paediatrica**, v. 98, n. 11, p. 1793–98, 2009.

TOWNSEND, D. E.; IRVING, R. L.; NAQUI, A. Comparison of the SimPlate coliform and Escherichia coli test with Petrifilm, three-tube MPN, and VRBA+ MUG methods for enumerating coliforms and E. coli in food. **Journal of food protection**, v. 61, n. 4, p. 444-449, 1998.

TUROLI, D.; TESTOLIN, G.; ZANINI, R.; BELLU R. Determination of oxidative status in breast and formula milk. **Acta Paediatrica**, v. 93, n. 12, p. 1569–1574, 2004.

UNAL, S.; DEMIREL, N.; SUL, D. Y.; ISIK, D. U.; EROL, S.; NESELIOGLU, S.; EREL, O.; BAS, A. Y. Phototherapy lights should be turned off during tube feeding. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 4, p. 1-5, 2017.

UNDERWOOD, B. A. Maternal vitamin A status and its importance in infancy an early childhood. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 517S-24S, 1994.

VASCONCELOS, M. J. O. B.; SILVA, A. C. S.; BARBOSA, J. M.; OLIVEIRA, M. G. O. A. **Aleitamento Materno: Importância e Situação Atual**. In: *Nutrição Clínica: Obstetrícia e Pediatria*. Rio de Janeiro: MedBook, 2011.

VIEIRA, A. A.; SOARES, F. V.; PIMENTA, H. P.; ABRANCHES, A. D.; MOREIRA. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. **Early Human Development**, v. 87, n. 8, p. 577-580, 2011.

VINUTHA, B.; METHA, M. N.; SHANBAG, P. Vitamin A status o pregnant women and effect of post partum vitamin A supplementation. **Indian Pediatrics**, v. 37, n. 11, p. 1188-93, 2000.

XAVIER, A. M.; RAI, K.; HEGDE, A. M. Total antioxidant concentrations of breastmilk e an eye-opener to the negligent. *Journal of Health. Population and Nutrition*, v.29, n. 6, p. 605-11, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Na evaluation of infant growth: the use and interpretation of antropometry in infants. *Bull. WHO*, v. 73, n. 2, p. 165-174, 1995.

WIGHT, N. E. Donor human milk for preterm infants. *Journal of Perinatology*, v. 21, n. 4, p. 249–254, 2001.

WHINTED, L. J.; HAMMOND, B. H.; CHAPMAN, K. W.; BOOR, K. J. Vitamin A degradation and light-oxidized flavor defects in milk. *Journal Dairy Science*, v. 85, n. 2, p. 351-4, 2002.

YEUM, K. J.; FERLAND, G.; PATRY, J.; RUSSEL, R. M. Relationship of plasma carotenoids, retinol and tocopherols in mothers and newborn infants. *The Journal of the American College of Nutrition*, v. 17, n. 5, p. 442-7, 1998.

ZAMBIANI, C. Oxidation reactions of vegetable oils and fats. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 33, n. 1, p. 1-7, 1999.

ZARBAN, A.; TAHERI, F.; TAIEBEH C.; SHARIFZADEH G.; KHORASHADIZADEH, M. Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Human Clostrum, Transitional and Mature Milk. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, v. 45, n. 2, p. 150–154, 2009.

ZHOU, Y.; WANG, Q.; EVERS, B. M.; CHUNG, D. H. Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis. *Pediatric Research*, v. 58, n. 6, p. 1192-7, 2005.

ZIEGLER, E. E. Infants of low- birth-weight: special needs and problems. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 41, n. 2, p. 440-6, 1985.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Você está sendo convidada para participar como voluntária de uma pesquisa. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, você deverá assinar este documento em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizada de forma alguma.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com as pesquisadoras Camila Carvalho Menezes nos telefones (31) 8887-2233/3559-1834 e Jaísa Oliveira Chaves no telefone (31) 99403-6545. O Comitê de Ética em Pesquisa/UFOP poderá esclarecer questionamentos quantos aos aspectos éticos da pesquisa, por meio do telefone (31) 3559-1368.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA

A pesquisa intitulada “**EFEITO DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DO LEITE HUMANO DESTINADO AOS BANCOS DE LEITE: IMPACTO SOBRE O PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS, VITAMINA A E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO***” tem por objetivo avaliar o efeito das condições de armazenamento, especialmente o armazenamento congelado (tempo x temperatura) e da luminosidade (diferentes embalagens) sobre o perfil de ácidos graxos, os teores de vitamina A (retinol) e da capacidade antioxidante *in vitro* do leite humano destinado aos bancos de leite. Portanto, para observar esses efeitos no leite humano. A coleta será realizada pelas pesquisadoras no seu domicílio, com agendamento prévio, não necessitando de nenhum deslocamento de sua parte.

Participando desse estudo você estará ajudando a melhorar a qualidade do leite humano do Banco de Leite e, assim, possibilitará o oferecimento aos prematuros de um leite mais potente para proteger sua saúde dos efeitos negativos de uma internação.

Você não sofrerá nenhum tipo de punição relacionada ao resultado da pesquisa e os dados oriundos da sua participação serão utilizados apenas para os fins propostos no estudo.

Esclarecemos que toda pesquisa envolve um risco inerente. Neste caso, o risco potencial é considerado baixo, uma vez que não implica em adoção de um procedimento que não seja rotineiro para a doação de leite. No entanto, reconhecemos a possibilidade de risco de constrangimento frente à possibilidade de não conseguir extrair a quantia necessária no momento agendado. Caso isto ocorra, as pesquisadoras deixarão você bem à vontade para agendar uma nova data para coleta. Além disto, como é feito no Banco de Leite Humano rotineiramente, nós ligaremos para você antes de retornar à sua casa, para sabermos se será

possível fazer a coleta. Em relação ao momento da coleta, ao identificar qualquer sinal de complicação na mama, encaminharemos você ao Banco de Leite Humano para atendimento, como já é feito rotineiramente durante o processo de doação.

Não haverá despesas na sua participação da pesquisa e, portanto, não haverá nenhum tipo de ressarcimento, pagamento ou gratificação financeira. Todos os dados coletados serão mantidos em sigilo respeitando a sua privacidade e ficarão arquivados na ENUT/UFOP sob responsabilidade da pesquisadora responsável por 5 anos e logo após serão incinerados. Os dados obtidos serão de uso específico para os propósitos da pesquisa.

É seu direito negar-se a responder qualquer pergunta do questionário, recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

Os resultados da pesquisa, sendo favoráveis ou não, serão apresentados em forma de Trabalho de Conclusão de Curso e serão divulgados em eventos científicos e na forma de publicação de artigo científico em periódico indexado na área, sempre preservando a identidade e a privacidade das participantes.

Camila Carvalho Menezes

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

Eu, _____,
RG/CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do mencionado estudo intitulado **“EFEITO DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E EFEITO DA LUMINOSIDADE NO LEITE HUMANO PARA OS BANCOS DE LEITE: IMPACTO SOBRE O PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS, OS TEORES DE VITAMINA A E A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO”**. Fui devidamente informada e esclarecida pelas pesquisadoras sobre os procedimentos da pesquisa, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento, se for o caso).

Local e data: _____

Nome e Assinatura: _____

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
OURO PRETO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito das condições de armazenamento do leite humano destinado aos Bancos de Leite: impacto sobre o perfil de ácidos graxos, vitamina A e capacidade antioxidante in vitro

Pesquisador: MARIA CRISTINA PASSOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71251517.9.0000.5150

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ouro Preto

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Ouro Preto

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.243.745

Apresentação do Projeto:

O leite humano (LH) é o alimento ideal para o recém-nascido (RN), contribuindo para o seu crescimento e desenvolvimento plenos, conferindo proteção imunológica, nutrição adequada, compostos bioativos e capacidade antioxidante. Nos Bancos de Leite Humano (BLH) é realizado o tratamento térmico e o armazenamento do LH como forma de garantir sua qualidade e ser ofertado aos bebês. Quanto ao armazenamento (congelamento), as evidências científicas que associam o potencial impacto de diferentes tempos e temperaturas sobre a capacidade antioxidante, perfil de ácidos graxos e teores de vitamina A (retinol) do LH, ainda são inconclusivos, como também o impacto da luz sobre esses teores, considerando que o LH sofre incidência da mesma nas etapas de processamento. Diante disto, os objetivos do trabalho serão: avaliar a qualidade higiênico-sanitária dos leites doados por meio de um checklist aplicado às nutrizes para verificar a qualidade dos procedimentos adotados para a ordenha e manipulação do leite humano, e da realização de análises microbiológicas (contagens de *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e termotolerantes, fungos e leveduras e mesófilos aeróbios totais). Outros objetivos serão verificar a interferência das etapas do processamento do leite humano adotadas pelo Banco de Leite Humano da Santa Casa da Misericórdia de Ouro Preto e o efeito da luminosidade sobre seus teores de compostos bioativos, capacidade antioxidante e perfil de

Endereço: Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP
Bairro: Campus Universitário **Cep:** 35.400-000
UF: MG **Município:** OURO PRETO
Telefone: (31)3559-1368 **Fax:** (31)3559-1370 **E-mail:** cep@propp.ufop.br

Continuação do Parecer: 2.243.745

ácidos graxos. Serão determinados os teores de vitaminas A, capacidade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS) e de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). As dosagens serão realizadas em leites armazenados em três temperaturas distintas (-3 °C, -8 °C e -18 °C) por diferentes tempos (0, 2, 4, 8 e 15 dias). Para avaliar o efeito da luminosidade será utilizado diferentes frascos (vidro transparente, âmbar e transparente envolvido com papel alumínio) para armazenamento do LH nas etapas de coleta, processamento e armazenamento.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito do armazenamento (congelamento), condições de tempo, temperatura e luminosidade sobre o perfil de ácidos graxos, os teores de vitamina A (retinol) e da capacidade antioxidante in vitro do leite humano destinados aos bancos de leite.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco potencial é considerado baixo, uma vez que não implica em adoção de um procedimento que não seja rotineiro para a doação de leite. No entanto, reconhecemos a possibilidade de risco de constrangimento frente à possibilidade de não conseguir ordenhar a quantidade necessária no momento agendado.

Benefícios:

Essa pesquisa possibilitará a detecção de pontos críticos do armazenamento do leite humano adotados pelos Bancos de Leite Humano no Brasil, que servirão de subsídios para promover uma melhoria no controle de qualidade dos serviços que compõem a Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano, visando fornecer um leite mais adequado em qualidade em relação à composição lipídica, de vitamina A e da capacidade antioxidante.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo objetiva avaliar as condições de armazenamento do leite humano.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresentou todos os termos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP
Bairro: Campus Universitário **Cep:** 35.400-000
UF: MG **Município:** OURO PRETO
Telefone: (31)3559-1368 **Fax:** (31)3559-1370 **E-mail:** cep@prop.ufop.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
OURO PRETO**



Continuação do Parecer: 2.243.745

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_961049.pdf	14/08/2017 19:16:43		Aceito
Outros	Carta_Anuencia_ENUT.pdf	14/08/2017 19:15:01	MARIA CRISTINA PASSOS	Aceito
Outros	Questionario_Projeto.doc	11/08/2017 13:55:52	MARIA CRISTINA PASSOS	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia.pdf	04/08/2017 09:59:27	MARIA CRISTINA PASSOS	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	12/07/2017 11:21:19	MARIA CRISTINA PASSOS	Aceito
TGLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Escelarecido.docx	12/07/2017 11:17:28	MARIA CRISTINA PASSOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investidor	Projeto_Plataforma_Brasil.doc	12/07/2017 11:15:34	MARIA CRISTINA PASSOS	Aceito
Folha de Rosto	plataforma_brasil.pdf	12/07/2017 10:22:34	MARIA CRISTINA PASSOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

OURO PRETO, 28 de Agosto de 2017

Assinado por:
Núncio Antônio Araújo Sól
(Coordenador)

Endereço: Morro do Cruzeiro-ICEB II, Sala 29 -PROPP/UFOP
Bairro: Campus Universitário CEP: 35.400-000
UF: MG Município: OURO PRETO
Telefone: (31)3559-1368 Fax: (31)3559-1370 E-mail: cnp@propp.ufop.br

ANEXO B – Questionário aplicado às doadoras

Data da visita: ___/___/_____

1- Identificação

Nome da doadora: _____

Data de nascimento: ___/___/_____

Endereço: _____

Referência: _____ Telefone: _____

2- Antecedentes obstétricos

Nº de gestações anteriores: _____ Nº de nascidos vivos: _____

Local de realização do pré-natal: _____

Nº de consultas: _____ Intercorrências durante a gestação: () Sim () Não

Se sim, quais: _____

Local de realização do parto: _____

Tipo de parto: _____

Data do Parto: _____ Idade Gestacional: _____ Tipo de parto: _____

Intercorrências durante o pós-parto imediato: () Sim () Não.

Se sim, quais: _____

3- Dados atuais da doadora

Peso: _____ Altura: _____

Problemas de saúde: () Sim () Não.

Se sim, quais: _____

4- Dados do bebê

Nome: _____ Idade: _____

Peso ao nascer: _____ Comprimento ao nascer: _____

Peso atual: _____ Comprimento atual: _____

Tipo de aleitamento:

() Aleitamento materno exclusivo (somente leite materno)

() Aleitamento materno predominante (leite materno, água e/ ou chá)

() Aleitamento materno misto (leite materno com outro tipo de leite)

() Aleitamento artificial (leites modificados, fórmulas).

Número de mamadas/dia: _____

Uso de bico: () Sim () Não. Uso de mamadeira: () Sim () Não

Seu bebê tem algum problema de saúde: () Sim () Não.

Se sim, quais: _____

5- Dados sociodemográficos

Escolaridade da mãe: () Fundamental completo () Fundamental incompleto
 () Médio completo () Médio incompleto () Superior completo () Superior incompleto.
 Ocupação da mãe: () Leve () Moderada () Vigorosa () Muito Vigorosa

6- Dados socioeconômicos

Situação de moradia: () Própria () Alugada () Cedida () Urbana () Rural
 Possui energia elétrica? () Sim () Não
 Possui rede de esgoto? () Sim () Não
 Possui água encanada/ tratada? () Sim () Não
 Possui filtro? () Sim () Não
 Possui coleta de lixo? () Sim () Não
 Possui algum convênio de saúde: () Sim () Não
 Quantos moradores na casa? _____ Quantos trabalham? _____ Quantas crianças?
 _____.
 Renda familiar bruta (nº de SM): () ≤1 SM () 1 a 3 SM () >3 e <5 SM
 () >5 SM () >10 SM.

6- Hábitos de vida

Fumante: () Sim () Não. Quantos cigarros por dia: _____

Álcool: () Sim () Não. Quantidade (mL) e frequência: _____

Atividade Física

Você realiza alguma atividade física?

() Sim () Não. Tipo/Frequência/Duração? _____

Uso de medicamento

Faz uso de algum medicamento? () Sim () Não.

Medicamento: _____ Motivo: _____ Frequência: _____

ANEXO C - Checklist aplicado às doadoras**Checklist de Procedimentos para Extração de Leite Humano**

Marque com um X os procedimentos adotados na extração do leite:

- () Coletar o leite nos frascos fornecidos pelo Banco de Leite Humano na primeira coleta e posteriormente usar copo de vidro fervido por 15 minutos.
- () Deixar escorrer sobre pano limpo até secar - não secar com pano por dentro.
- () Escolher local reservado, limpo, sem animais por perto, ao extrair leite.
- () O forro da casa é impermeável (alvenaria).
- () Evitar a entrada de vento durante a extração mantendo as janelas fechadas.
- () Prender cabelos, usar máscara ou similar – cobrir nariz e boca.
- () Lavar mãos com bastante sabão e água corrente - secar bem c/ toalha limpa.
- () Lavar as mamas apenas com água e secar com toalha limpa.
- () Desprezar os três primeiros jatos de leite extraídos.
- () Esgotar o leite diretamente no frasco estéril vazio.
- () Ao terminar a extração, fechar o frasco e congelar imediatamente.
- () Na próxima extração usar outro recipiente de vidro estéril.
- () Colocar o leite coletado dentro do frasco em cima do leite sob congelamento.
- () Só retirar o frasco do congelamento no momento de acrescentar mais leite, e recolocar imediatamente no congelador com o frasco esteja bem fechado.
- () Não encher o frasco totalmente até a tampa, deixar a 3 cm da borda.
- () Manter os frascos sempre no freezer/congelador por no máximo 15 dias. Se descongelar a geladeira ou estiver vencendo prazo, avisar o BLH.
- () Se usar bomba tira leite: lavar com água e sabão após cada uso, enxaguar bem e ferver por 15 minutos, a contar do início da fervura, antes de cada uso. Deixar secar totalmente, não secar com pano, protegida em recipiente limpo e fechado ou coberto com pano limpo exclusivo.
- () Uso de concha: seguir os mesmos cuidados da bomba tira leite.
- () Não permanecer com leite parado mais que 20 minutos.
- () Verificar a camada de gelo do congelador ($\leq 0,5$ cm).