



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

KARINE SILVEIRA NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO USO DA TÉCNICA DE
LIOFILIZAÇÃO NO PROCESSO DE CONSERVAÇÃO DO LEITE
HUMANO

Manaus

2014

KARINE SILVEIRA NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO USO DA TÉCNICA DE
LIOFILIZAÇÃO NO PROCESSO DE CONSERVAÇÃO DO LEITE
HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Universidade Federal do Amazonas.

Orientadora: Prof. Dra. Helyde Albuquerque Marinho.

Manaus

2014

N244a Nascimento, Karine Silveira
Avaliação da Eficácia do Uso da Técnica de Liofilização no
Processo de Conservação do Leite Humano / Karine Silveira
Nascimento. 2014
62 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Helyde Albuquerque Marinho
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Leite Humano. 2. Liofilização. 3. Banco de Leite Humano. 4.
Embalagem. I. Marinho, Helyde Albuquerque II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me iluminar e me fazer chegar até aqui.

À minha família: pais, irmãs e cunhados, que com muito amor, sempre me apoiaram.

À minha orientadora, Prof. Dra. Helyde Albuquerque Marinho, pelo exemplo de profissional na área da pesquisa, por ter me aceitado como orientada e apoio durante todo o projeto.

À CAPES/CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Banco de Leite Fezinha Anzoategui do Instituto da Mulher Dona Lindu, Manaus/Amazonas, em especial à coordenadora, Rafaela Faria Gomes da Silva.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA pela parceria no programa e neste projeto. À Sra. Maria do Socorro Barreto da Silva e à Sra. Maria Inêz de Oliveira Ferreira, técnicas responsáveis pelos laboratórios onde foram realizados os experimentos. Agradeço pelo carinho, disponibilidade e preocupação.

À Universidade Federal do Amazonas – UFAM, professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, em especial à professora Dra. Ariane Kluczkovski. Agradeço ao Msc. Antônio Fábio Lopes por gentilmente disponibilizar o laboratório e seu tempo para me auxiliar.

Às mulheres que compreenderam o valor da doação de leite materno para salvar muitas crianças. E às crianças, em especial as nascidas no interior do estado do Amazonas, que puderem, quem sabe um dia, utilizar do leite humano liofilizado como alimento.

RESUMO

O leite humano, através das peculiaridades de sua composição nutricional, é sem dúvida o alimento mais adequado para superar deficiências, permitindo ao recém-nascido uma ótima adaptação ao seu novo ambiente. A liofilização é uma operação de remoção da água por sublimação do gelo. O uso da tecnologia da liofilização ou a desidratação a frio (*freeze dry*) é um processo confiável de conservação de produtos biológicos, sendo isento de conservantes ou produtos químicos. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do processo de liofilização nos aspectos nutricionais e como alternativa de conservação do leite humano, bem como avaliar a embalagem que melhor conserva este alimento liofilizado. Para a liofilização, foram coletadas amostras de 600mL de colostro e 600mL de leite maduro pasteurizados no Banco de Leite Humano Fezinha Anzoategui do Instituto da Mulher Dona Lindu, Manaus/AM. Foram determinados os conteúdos de lipídios, proteínas, carboidratos, umidade e cinzas, além da determinação da vitamina A e prova de reconstituição. O protocolo de pesquisa inclui três condições de estocagem: tempo zero e três meses, assim como armazenamento em embalagem plástica e metálica sob refrigeração. As análises foram realizadas em triplicata em seguida analisadas estatisticamente. As médias dos teores de lipídio e proteína do colostro liofilizado foram de 1,64 g/dL e 1,70 g/dL, respectivamente. Observou-se que teor de proteína do leite maduro liofilizado (1,59 g/dL) encontrava-se superior aos valores já observados em outros estudos. A média dos teores de carboidrato do leite maduro liofilizado (7,84 g/dL) está também em concordância com a literatura. Na comparação entre os tipos de embalagem, não houve diferenças significativas dos teores de umidade, lipídio, carboidrato e cinzas do colostro liofilizado armazenado por três meses em embalagem metálica ou plástica. Porém, o teor de proteína apresentou diferença significativa, sugerindo que a embalagem metálica é uma melhor opção na conservação do colostro liofilizado em relação à preservação desse nutriente. Na comparação entre os tipos de embalagem, não houve diferenças significativas dos teores de umidade, proteína, carboidrato e cinzas do leite maduro liofilizado armazenado por três meses em embalagem metálica ou plástica. Porém, o teor de lipídio apresentou diferença significativa, sugerindo que a embalagem metálica é uma melhor opção na conservação do leite maduro liofilizado em relação à preservação desse nutriente. As concentrações de vitamina A encontradas nos colostros antes e após a liofilização foram 1,21 μ mol/L e 1,16 μ mol/L, respectivamente. Em relação ao leite maduro, foram encontrados os teores de 1,18 μ mol/L antes da liofilização e 1,14 μ mol/L após o processamento. A perda de vitamina A durante o processamento provavelmente é resultante da exposição dos frascos à luz durante o descongelamento e reenvaso. No procedimento utilizado para reconstituição pôde-se verificar que a cor foi semelhante ao leite não-liofilizado, a fluidez continuou estável, semelhante ao leite não-liofilizado e a diluição foi plena, sem formação de precipitados. A técnica de liofilização mostrou-se favorável para conservação do leite humano já que preservou os nutrientes presentes no leite humano. Sugere-se que a embalagem metálica seja a melhor alternativa para a conservação do leite humano liofilizado.

Palavras-chave: leite humano, liofilização, banco de leite humano, embalagem.

ABSTRACT

Human milk, through the peculiarities of its nutritional composition is undoubtedly the most suitable to overcome such shortcomings food, allowing the newborn optimum adaptation to their new environment. Lyophilization is an operation of removing water by sublimation of ice. The use of lyophilization technology dehydration by cold (freeze dry) is a reliable method of preservation of biological products, being free from preservatives or chemicals. The objectives of this study were to evaluate the effects of freeze drying on the nutritional aspects and as an alternative conservation of human milk, as well as evaluating the package which best preserves this freeze dried food. For lyophilization, samples of 600 mL of colostrum and mature milk pasteurized 600mL were collected in the Human Milk Bank Fezinha Anzoategui of Woman Institute Dona Lindu, Manaus/AM. We determined the contents of lipids, proteins, carbohydrates, moisture and ash, besides the determination of vitamin A and proves reconstitution. The research protocol includes three storage conditions: time 0, three months in plastic wrap and foil pouch for three months under refrigeration. Analyses were performed in triplicate and then analyzed statistically. The average of the levels of lipid and protein were lyophilized colostrum of 1.64 g / dl and 1.70 g / dl, respectively. It was observed that protein content of mature milk lyophilized (1.59 g / dL) was still higher than the values previously observed in other studies. The average percentage of carbohydrate in the mature milk lyophilized (7.84 g / dL) is also in agreement with the literature. In comparing the types of packaging, there were no significant differences in moisture, lipid, carbohydrate and ash lyophilized colostrum stored for three months in a metal or plastic container. However, the protein content showed significant difference, suggesting that the metal packaging is a better option in the conservation of lyophilized colostrum for the preservation of this nutrient. In comparing the types of packaging, there were no significant differences in moisture, protein, carbohydrate and ash lyophilized mature milk stored for three months in a metal or plastic container. However, the lipid content significantly different, suggesting that the metal packaging is a better option in the conservation of the lyophilized mature milk in relation to the preservation of this nutrient. The concentration of vitamin A found in the colostrum before and after lyophilization were 1.21 μ mol/L and 1.16 μ mol/L, respectively. Regarding mature milk, the levels of 1.18 μ mol/L before lyophilization and 1.14 μ mol/L were found after processing. The loss of vitamin A during processing is probably the result of exposure to light bottles during thawing and re-bottling. The procedure used for reconstitution could be seen that the color was similar to non-lyophilized milk, fluidity remained stable, similar to the non-lyophilized milk and dilution was full, without formation of precipitates. The freeze-drying technique was favorable for preservation of human milk as it preserved the nutrients in human milk. It is suggested that the canister is the best alternative for the conservation of lyophilized human milk.

Keywords: Human milk, freeze drying , milk bank, packaging.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Justificativa.....	12
1.2. Objetivos	12
1.2.1. Objetivo Geral.....	12
1.2.2. Objetivos Específicos	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1. Aleitamento Materno.....	14
2.2. Leite Humano	17
2.2.1. Proteínas	20
2.2.2. Lipídio	21
2.2.3. Carboidrato	22
2.2.4. Vitaminas e Minerais.....	22
2.2.5. Aspecto imunológico e protetor.....	25
2.3. Banco de Leite Humano	26
2.4. Terapia Nutricional para o recém-nascido de baixo peso e prematuro.....	33
2.5. Liofilização	33
2.6. Leite Humano Liofilizado.....	34
2.7. Tempo de Vida Útil e Embalagem	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Liofilização	37
3.2. Determinação da Composição Centesimal.....	37
3.2.1. Proteína Total.....	37
3.2.2. Lipídios	39
3.2.3. Cinzas	39
3.2.4. Carboidrato	40

3.2.5. Umidade.....	40
3.2.6. Vitamina A.....	40
3.3. Análise Microbiológica	41
3.4. Análise Sensorial e Prova de Reconstituição	41
3.5. Tempo de Vida Útil e Embalagem	41
3.6. Análises Estatísticas.....	42
3.7. Aspectos Éticos da Pesquisa	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1. Leite Humano Liofilizado no Tempo 0	43
4.1.1. Colostro	44
4.1.2. Leite Maduro.....	46
4.2. Armazenamento e Tipos de Embalagens	48
4.2.1. Colostro	48
4.2.2. Leite Maduro.....	49
4.3. Vitamina A.....	51
4.4. Prova da Reconstituição	52
4.5. Análise Microbiológica	52
5. CONCLUSÃO	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

A importância da nutrição durante todo o ciclo vital é absolutamente óbvia. O ser humano precisa alimentar-se para sobreviver. Na infância, além da sobrevivência, a boa nutrição é indispensável para um crescimento e um desenvolvimento adequados. Também na infância devem ser estabelecidos os bons hábitos alimentares, que continuarão na adolescência e na idade adulta, pois, a prevenção de algumas doenças degenerativas do adulto deve começar na infância (OLIVEIRA; MARCHINI, 2008).

A primeira infância constitui provavelmente o melhor investimento social existente, pois é de 0 a 6 anos de idade que a criança estabelece a arquitetura cerebral que lhe permitirá aprender, sentir, relacionar-se, comportar-se e desenvolver-se ao longo da vida. Porém, este desenvolvimento pode não ocorrer plenamente se as conexões cerebrais da criança não forem utilizadas e estimuladas. Por isso é tão importante que governo e sociedade invistam na formação, educação, saúde e nos diferentes aspectos que cercam a vida das crianças brasileiras (BRASIL, 2012).

Os cuidados com a criança nos primeiros anos de vida e a estimulação precoce exercem uma função importante no desenvolvimento emocional, cognitivo e social. É parte da avaliação integral da saúde da criança manter o vínculo dela com a família, com os serviços de saúde, propiciando oportunidades de abordagem para a promoção da saúde, amamentação, alimentação complementar, de hábitos de vida saudáveis, vacinação, prevenção de doenças e agravos e provendo o cuidado em tempo oportuno (BRASIL, 2012).

O Ministério da Saúde (MS) do Brasil e a Organização Pan-Americana de Saúde em consonância com as recomendações da Organização Mundial de Saúde enfatizam a importância do aleitamento materno exclusivo até o sexto mês de vida da criança. A partir de então, a amamentação deve ser complementada com outros alimentos e mantida até pelo menos os dois anos de idade, sendo este considerado o método de alimentação por excelência para o bebê, por sua eficiente contribuição para a sua saúde (BRASIL, 2009; OPAS, 2009; VASCONCELOS, 2006).

O aleitamento natural deve ser iniciado imediatamente após o parto, sob regime de livre demanda e sem horários pré-fixados, estando a mãe em boas condições e o recém-nascido com manifestação ativa de sucção e choro (OLIVEIRA; MARCHINI, 2008).

As ações de incentivo ao aleitamento materno são baseadas em promoção, proteção e apoio à mulher, desde o início da gestação e durante todo o puerpério, e incluem ações realizadas pela Área de Saúde da Criança, Programas de Agentes Comunitários de Saúde, Comunidade Solidária, Vigilância Sanitária e Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde (CARVALHO; TAMEZ, 2002).

O leite materno é um alimento nutricionalmente completo, espécie-específico, que corresponde perfeitamente às peculiaridades fisiológicas, metabólicas e imunológicas da criança. Ele possui uma perfeita composição química, beneficiando a criança sob os aspectos nutricionais, imunológicos, psicológicos e cognitivos (VASCONCELOS et al., 2011). O leite materno é o alimento totalmente adequado às necessidades nutricionais do lactente (MOURA, 2002).

Entre os humanos, o aleitamento materno não só oferece uma fonte de nutrientes especialmente adaptados às condições digestivas e metabólicas da criança, como também oferece proteção contra microrganismos patogênicos, favorece o estabelecimento de uma forte relação mãe e filho, reduz a probabilidade do desenvolvimento de alergias, além de reduzir a fertilidade materna (CURY, 2009).

Atualmente, reconhece-se que o leite materno contém todos os nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das crianças, além de ser facilmente digerido, sendo um fator protetor contra a desnutrição energético-proteica (DEP) (AUGUSTO, 2007; MARQUES, 2004). Também protege o lactente contra várias doenças e infecções, principalmente as diarreias e infecções respiratórias, pela ausência de risco de contaminação e pela presença de anticorpos e fatores anti-infecciosos (CHANTRY et al., 2006; TOMA, 2008).

Alguns estudos relatam que o leite materno, devido a sua composição específica, pode atuar como fator protetor contra o sobrepeso e a obesidade na infância (BALABAN et al., 2004; BALABAN; SILVA, 2004; MONTEIRO; SIQUEIRA, 2007). Sugere-se que as crianças que são amamentadas desenvolvem mecanismos eficazes de autorregulação do consumo energético, ao contrário das alimentadas em mamadeiras, cuja ingestão é controlada pelos pais, podendo promover uma oferta excessiva de leite (BALABAN; SILVA, 2004).

Outro benefício oferecido pelo leite materno é a proteção contra a carência de vitamina A e anemia ferropriva, sendo a melhor fonte de vitamina A para o lactente nos primeiros 6 meses de vida, principalmente quando a amamentação é realizada de forma exclusiva. Essa proteção pode continuar mesmo depois de terminada a lactância

materna, compensando períodos de ausências ou de baixa ingestão, ocasionados por alimentos deficientes nesse nutriente. Por sua vez, o desmame precoce é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de anemia no primeiro ano de vida. O leite materno possui uma elevada disponibilidade de ferro (50%), a qual pode ser reduzida em até 80% com a introdução de outros alimentos na dieta da criança (LEVY-COSTA; MONTEIRO, 2004; SPINELLI et al., 2005), sendo muito importante a oferta de carnes e vísceras, mesmo que em pequena quantidade, com a introdução da alimentação complementar (BALABAN et al., 2004; BALABAN; SILVA, 2004).

É indiscutível a importância do aleitamento materno como a maneira mais adequada de fornecer alimento para o crescimento e o desenvolvimento saudáveis dos lactentes, com influência também na saúde biológica e emocional do binômio mãe-filho (BRASIL, 2008; OMS/UNICEF, 1989). No entanto, há casos em que os recém-nascidos são separados de suas mães para receber a assistência necessária e adequada à manutenção de suas funções vitais, podendo a amamentação sofrer prejuízos caso a instituição e os profissionais de saúde não estejam preparados para promover, proteger e apoiar o aleitamento materno como o melhor método para uma adequada nutrição infantil (ACCIOLY et al., 2009).

Em situações em que a amamentação está contraindicada ou que a prática está dificultada, seja por motivos ligados à criança ou à mãe, o uso do leite humano ordenhado (LHO) pode representar o diferencial no cuidado do recém-nascido. Já está bem estabelecida a relação positiva entre alimentação de recém-nascidos prematuros com leite humano é um melhor prognóstico do desenvolvimento neurológico, menor tempo de internação e menor perda de peso quando comparados com aqueles alimentados com fórmula láctea. Neste sentido, os estabelecimentos de assistência à saúde materna e/ou infantil que possuem banco de leite humano (BLH) podem garantir a oferta deste alimento como primeira opção para recém-nascidos de risco e/ou bebês doentes, contribuindo com a prevenção de doenças e a redução da mortalidade neonatal (BICALHO-MANCINI; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2004).

O BLH pode ser compreendido como um serviço especializado, responsável por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno e execução de atividades de coleta da produção láctea da nutriz, do seu processamento, controle de qualidade e distribuição (BRASIL, 2006).

A Rede Nacional de Bancos de Leite Humano do Brasil (REDE BLH-BR) é a maior e mais bem estruturada rede de Bancos de Leite Humano do mundo. As ações dos

BLH-BR não se resumem a um simples local de coleta de um produto antes comercializado, como também estão comprometidas com a produção do aleitamento materno, constituindo-se em importante estratégia de política governamental em prol da amamentação (ALMEIDA, 1999; BRASIL, 2009).

A proposta deste estudo vem ao encontro da real necessidade da implantação de uma técnica que aumente o tempo de vida útil do leite humano para que ele possa atingir, principalmente, municípios do interior do Estado do Amazonas que não possuem bancos de leite humano.

1.1 Justificativa

O leite materno é um alimento rico em água e nutrientes, tornando-o um produto altamente perecível. O melhoramento tecnológico e a implantação de técnicas alternativas para a conservação têm o objetivo de aumentar o tempo de vida útil e a segurança alimentar do produto.

A inexistência de bancos de leite humano nos municípios do interior do Estado do Amazonas restringe o acesso de lactentes nascidos nessas áreas e que necessitam deste alimento fundamental.

Nesse contexto, a liofilização, é uma alternativa segura de conservação do leite humano e assim facilitará o transporte do leite liofilizado para diversas áreas desse estado.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

Liofilizar e avaliar por meio de análises físico-químicas, microbiológicas e nutricionais a qualidade do leite materno do Banco de Leite Humano do Instituto da Mulher Dona Lindu localizado na cidade de Manaus/Amazonas.

]

1.2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica do leite humano coletado e processado em um banco de leite;
- Avaliar as características nutricionais do leite humano após o processo de liofilização;
- Avaliar o tempo de vida útil do leite humano liofilizado;
- Analisar os tipos de embalagem e a que melhor conserva o leite humano liofilizado.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aleitamento Materno

A prática da amamentação tem-se revelado como a mais sábia estratégia natural de vínculo, afeto, proteção e nutrição para a criança e constitui a mais sensível, econômica e eficaz intervenção para a redução da morbimortalidade infantil (BRASIL, 2009).

O aleitamento materno é um processo que envolve fatores fisiológicos, ambientais, e emocionais. Sabe-se que a produção de leite é determinada pela ação hormonal já na gestação e é intensificada quando ocorre o aleitamento materno de forma adequada (VITOLLO, 2008).

A glândula mamária consiste em um epitélio glandular, composto por células produtoras de leite e em um sistema de ductos envolvidos em tecido conectivo e gordura (REGO, 2001; WORTHINGTON-ROBERTS, 1997).

A iniciação e manutenção da lactação fazem parte de um complexo sistema neuroendócrino. Envolve a inervação do mamilo e tecidos adjacentes, a medula espinhal, o hipotálamo e a hipófise, com seus hormônios, em especial prolactina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), glicocorticoides e ocitocina (OMS, 1996; REGO, 2001).

O processo de produção de leite ocorre em duas etapas distintas. Na primeira, ocorre a produção e secreção de leite no lúmen alveolar e, na segunda, o leite passa pelo sistema de ductos até ser ejetado (ACCIOLY et al., 2009).

O processo secretório é ativado pelo estímulo de sucção do bebê. A inervação do mamilo e da aréola é abundante, com conexões entre o sistema nervoso autônomo e sensitivo. O estímulo aí originado é encaminhado, via medula espinhal, aos neurônios localizados no hipotálamo. Estes inibem a secreção do fator de inibição da prolactina – a dopamina, liberando a sua secreção pela hipófise anterior que alcança, por via sanguínea, as células dos alvéolos mamários, estimulando a produção láctea (OLIVEIRA et al., 2005).

O leite secretado não flui espontaneamente até os seios lactíferos por causa da pressão capilar, e só acontece através do reflexo da descida do leite, que ocorre por compressão dos alvéolos pelas células epiteliais que as rodeiam. Esta contração é

estimulada pela ocitocina, hormônio liberado pela hipófise posterior (ACCIOLY et al., 2009).

Para a manutenção da secreção láctea é necessário o constante esvaziamento da mama, pois quando o leite se acumula nos ductos, estes podem comprimir os alvéolos mamários e impedir a continuidade do processo secretor (ACCIOLY et al., 2009).

A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificam o aleitamento materno nas seguintes categorias:

- Aleitamento materno exclusivo (AME): quando a criança recebe somente leite materno, direto da mama ou ordenhado, ou leite humano de outra fonte, sem outros líquidos ou sólidos, com exceção de gotas ou xaropes contendo vitaminas, sais de reidratação oral, suplementos minerais ou medicamentos.
- Aleitamento materno predominante: quando a criança recebe, além do leite materno, água ou bebidas à base de água (água adoçada, chás, infusões), sucos de frutas.
- Aleitamento materno: quando a criança recebe leite materno (direto da mama ou ordenhado), independentemente de receber ou não outros alimentos.
- Aleitamento materno complementado: quando a criança recebe, além do leite materno, qualquer alimento sólido ou semissólido com a finalidade de complementá-lo, e não de substituí-lo. Nessa categoria a criança pode receber, além do leite materno, outro tipo de leite, mas este não é considerado alimento complementar.
- Aleitamento materno misto ou parcial: quando a criança recebe leite materno e outros tipos de leite.

Dentre os benefícios trazidos pela prática da amamentação, podemos citar: prevenção contra doenças infecciosas e diarreicas; proteção contra alergias; favorecimento no crescimento e desenvolvimento intelectual, entre outros, além de intensificar as relações da mãe com o neonato (REZENDE, 2005).

Não obstante, notam-se também os benefícios econômicos, que impedem a interrupção da alimentação da criança por dificuldades financeiras, e as vantagens para a mãe, como menores possibilidades de desenvolver câncer de mama, maior rapidez na involução uterina e proteção contra a gravidez nos primeiros meses após o parto (ANDRADE, 1981).

A OMS preconiza a amamentação exclusiva e sob livre demanda até os seis meses de idade, e sua manutenção, acrescida de outras fontes nutricionais, até os vinte e quatro meses ou mais (BRASIL, 2012).

No entanto, muitos são os fatores que interferem na prática do aleitamento materno levando ao desmame precoce, podendo ser estes referentes à mãe, como nível socioeconômico, idade, paridade, escolaridade, cultura, inserção no mercado de trabalho, falta de conhecimento sobre os benefícios do aleitamento materno (VIEIRA et al., 2004).

Vários são os fatores para a baixa frequência do aleitamento materno, desde as dúvidas e dificuldades da nutriz, até o acesso a serviços especializados com profissionais qualificados, principalmente após a alta hospitalar. O grande desafio da equipe de saúde está em entender os reais motivos pelos quais muitas mulheres deixam de amamentar (SILVA, 2000).

Apesar de todos os esforços para incentivar o aleitamento materno em nosso meio, o desmame precoce ainda é um desafio para os profissionais de saúde (VITOLLO, 2008).

Embora tenha havido um aumento considerável do número de crianças amamentadas nos últimos anos na maioria dos países, inclusive no Brasil, a duração do aleitamento materno ainda se encontra aquém do cumprimento das metas e recomendações nacionais e internacionais (VASCONCELOS et al., 2011).

As discussões para resgatar a prática do aleitamento natural começaram a aumentar em todo o mundo na década de 1970. Diversos países assinaram acordos internacionais com o objetivo de promover, proteger e apoiar ações de incentivo ao aleitamento materno, mas mesmo assim, ainda hoje, elevar as taxas de amamentação exclusiva durante os primeiros seis meses de vida mostra-se uma tarefa difícil em todo o mundo, inclusive no Brasil (ARAÚJO, 2002).

De acordo com a I Pesquisa de Prevalência do Aleitamento Materno nas capitais brasileiras e Distrito Federal, realizada em 1999 pelo Ministério da Saúde, a duração mediana da amamentação foi de 10 meses e a da amamentação exclusiva, de apenas 23 dias.

Em 2008, a II Pesquisa de Prevalência do Aleitamento Materno nas capitais brasileiras e Distrito Federal verificou um aumento da amamentação para 11 meses, porém, no que se refere ao aleitamento materno exclusivo, a duração mediana continuou muito baixa, de apenas 1,8 mês (54 dias), no conjunto das capitais brasileiras e Distrito

Federal. Em relação às macrorregiões brasileiras, a região Centro-Oeste apresentou maior estimativa de duração do AME (67 dias), seguida das regiões Norte (66 dias), Sul (59 dias), Sudeste (55 dias) e por último da região Nordeste, com a pior situação (35 dias).

Constatou-se aumento da prevalência de AME em crianças menores de 4 meses de idade nas capitais brasileiras e Distrito Federal, de 36%, em 1999, para 51%, em 2008. A comparação do percentual de crianças entre 9 e 12 meses amamentadas também mostrou um aumento de 42% em 1999 para 59% em 2008 (BRASIL, 2009).

Esses achados apontam que o desmame precoce ainda é um importante problema de saúde pública no Brasil, necessitando, portanto, de um maior fortalecimento das ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno em todo o país (VASCONCELOS et al., 2011).

2.2. Leite Humano

Todos os leites de mamíferos têm composições bioquímicas altamente específicas. Tais composições refletem, em geral, uma adaptação a necessidades fisiológicas espécie-específicas, assegurando aos descendentes sua sobrevivência, além de ótimo crescimento e desenvolvimento (ANDERSON, 1985).

O recém-nascido humano, particularmente, se pré-termo, demonstra uma imaturidade no desenvolvimento das funções digestiva, metabólica e excretora. Esta imaturidade se traduz por múltiplas deficiências enzimáticas, que causam modificações nas funções gástrica e pancreática (ROYER, 1978).

O leite humano, através das peculiaridades de sua composição nutricional, é sem dúvida o alimento mais adequado para superar tais deficiências, permitindo ao recém-nascido uma ótima adaptação ao seu novo ambiente (LAURINDO et al., 1992).

O leite é a primeira alimentação humana e fonte de nutrientes para as funções biológicas, sendo considerado o melhor alimento para crianças, por ter papel muito importante na proteção imunológica contra doenças infecciosas, na adequação nutricional e no desenvolvimento afetivo e psicológico (MORGANO et al., 2005).

O leite humano contém todas as substâncias usuais necessárias para energia e crescimento fetal. Essas substâncias incluem duas proteínas, a caseína e a lactoalbumina, um açúcar de digestão muito fácil, a lactose (formada por uma molécula

de glicose e outra de galactose), e grande quantidade de substâncias gordurosas, como colesterol e fosfolipídios. Além disso, contém pequenas quantidades de vitaminas e grandes quantidades de fosfato de cálcio (GUYTON, 2011).

O leite humano, além de conter fatores de crescimento para o lactente, é uma fonte de inúmeros componentes multifuncionais, que apresentam ação antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante além de serem fatores de crescimento para bactérias probióticas benéficas a saúde do hospedeiro como as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (TERESA NETO, 2006).

A amamentação oferece inúmeros benefícios para a saúde da criança, sendo a melhor maneira capaz de promover seu desenvolvimento integral, pois o leite materno fornece os nutrientes necessários para a criança iniciar uma vida saudável e se modifica conforme seu crescimento para continuar atendendo às suas necessidades (VIEIRA et al., 2004). Por isso, é o alimento ideal não somente para recém-nascidos a termo, como também é o mais indicado para prematuros (TRINDADE, 1999).

O leite materno é um líquido rico em gordura, minerais, vitaminas, enzimas e imunoglobulinas que protegem contra doenças. Apesar de o leite maduro ser formado por cerca de 87% de água, os restantes 13% são uma poderosa combinação de elementos, fundamentais para o crescimento e desenvolvimento da criança (GIOIELLE et al., 2009).

A variação química do leite humano modifica-se com o tempo, de modo a se adaptar às características fisiológicas e às necessidades nutricionais da criança (MOURA, 2002).

A composição do leite humano varia entre as mulheres, em relação à própria mulher, com diferenças relacionadas com a composição em energia, macronutrientes e micronutrientes. Os fatores que podem influenciar esta composição são individualidade genética, nutrição materna, fase de lactação, além de técnicas de amostragem, armazenamento e medição (PICCIANO, 2001).

O colostro humano é definido como o primeiro produto da secreção láctea da nutriz, até o 7º dia pós-parto (BRASIL, 2008). Apresenta aspecto amarelado e espesso, possui maior conteúdo de proteínas, vitaminas lipossolúveis e minerais, como sódio e zinco, e menor teor de gordura, lactose e vitaminas hidrossolúveis, quando comparado com o leite maduro. O volume produzido varia amplamente, de 10 a 100mL/dia, com média em torno de 30mL, aumentando gradualmente até atingir a composição do leite maduro. Possui ainda altas concentrações de fatores de defesa, como as

imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG), lisozimas, lactoferrina, fator bífido e outras substâncias imunomoduladoras, além de agentes anti-inflamatórios, destacando-se os fatores de crescimento e os leucócitos, conferindo proteção ao recém-nascido (AKRÉ, 1997).

Pelas suas características nutricionais e imunológicas, o colostro está bem adaptado às necessidades específicas do recém-nascido. Os seus rins, imaturos, não conseguem processar grandes volumes de líquidos; a produção de lactase e outras enzimas intestinais está começando; antioxidantes e quinonas são necessários para a proteção contra o dano oxidativo e a doença hemorrágica; as imunoglobulinas forram a sua imatura flora intestinal, impedindo a aderência de microrganismos patógenos; e os fatores de crescimento estimulam os seus sistemas vitais (AKRÉ, 1997).

O leite de transição é aquele produzido no período intermediário entre o colostro e o leite maduro, ou seja, aquele produzido entre o 7º e o 14º dia após o parto (BRASIL, 2008). Nessa fase ocorre diminuição na concentração de proteínas e vitaminas lipossolúveis, porém essas continuam elevadas. A lactose, a gordura, o conteúdo calórico e as vitaminas hidrossolúveis aumentam, variando a composição do leite até se transformar em leite maduro (AKRÉ, 1997).

A composição do leite maduro, produzido em torno do 15º dia após o parto (BRASIL, 2008), varia não apenas entre as mães, como também entre as mamas da própria mãe, entre as mamadas e até no curso da mesma mamada (AKRÉ, 1997). O leite inicial da mamada é mais fino e aquoso, pois, tem a função de suprir a sede e as necessidades líquidas do bebê, enquanto o leite do final da mamada tem quatro vezes mais gordura que o leite inicial, com a função de fornecer calorias ao lactente (PONS et al., 2000).

As variações individuais podem ser afetadas por fatores maternos como idade, paridade, estado nutricional e uso de drogas e medicamentos (VASCONCELOS et al., 2011).

O leite materno tem em sua composição nutrientes, que mesmo em pequenas quantidades, suprem as necessidades da criança, por sua biodisponibilidade elevada. É constituído de 87,5% de água, o que promove a adequada hidratação do lactente durante os primeiros 6 meses de vida, descartando a necessidade de oferta de água (GOUVEIA; LAMOUNIER; VIEIRA, 2009).

2.2.1. Proteínas

O leite humano maduro apresenta menor concentração de proteína entre os mamíferos, o seu conteúdo proteico médio é em torno de 1,15g/100mL, existindo ampla variação entre as mães. A proteína nutricionalmente disponível pode ser ainda menor que 0,8g/100mL, se corrigida para proteínas do soro, visto que resistem à proteólise e, portanto, não são absorvíveis. No entanto, essas baixas concentrações são adequadas para o crescimento normal e resultam em uma carga de soluto adequadamente baixa para os rins imaturos do bebê (AKRÉ, 1997).

As proteínas do leite humano são compostas por 20% de caseína e 80% por proteínas do soro (alfalactoalbumina, lactoferrina, lisozima, imunoglobulinas IgA, IgG, e IgM e albumina). Essa proporção promove a redução do tempo de esvaziamento gástrico e facilita a digestão (AKRÉ, 1997).

O leite materno tem elevadas concentrações de aminiácidos livres e cistina, que são essenciais para o feto e o recém-nascido, especialmente o prematuro, pois a cistationase, enzima que catalisa a transulfuração de metionina e cistina, está ausente no cérebro e no fígado. A taurina exerce papel importante na conjugação dos sais biliares e, portanto, na absorção de gorduras, além de seu papel como neurotransmissor e neuromodulador no desenvolvimento do sistema nervoso central (AKRÉ, 1997).

As proteínas do leite humano são estrutural e qualitativamente diferentes das do leite bovino. Do conteúdo protéico do leite humano, 80% são constituídos pela lactoalbumina, enquanto que no leite de vaca a caseína corresponde a aproximadamente 80%. Desse modo, a relação proteínas do soro/caseína do leite humano é aproximadamente 80/20, enquanto a do leite bovino é 20/80. A baixa concentração de caseína no leite humano resulta na formação de coalho gástrico mais leve, com flóculos de mais fácil digestão e com reduzido tempo de esvaziamento gástrico (SILVA et al., 2007).

O leite humano contém, também, diferentemente do leite de vaca, maiores concentrações de aminoácidos essenciais de alto valor biológico (cistina e taurina) que são fundamentais para o crescimento do sistema nervoso central. Isso é particularmente importante para o prematuro, que não consegue sintetizá-los a partir de outros aminoácidos por deficiência enzimática (SILVA et al., 2007).

2.2.2. Lipídio

Os lipídios do leite representam a maior fonte de energia (TINOCO et al., 2007), pois suprem de 40% a 50% da calorias necessárias (GOUVEIA, LAMOUNIER; VIEIRA, 2009). Seu conteúdo no leite maduro varia de 3 a 4 g/dL, enquanto o colostro possui concentração lipídica menor, em torno de 1,8 a 2,9g/dL (AKRÉ, 1997).

Os ácidos graxos essenciais, linoleico e alfa-linolênico, são precursores dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, incluindo os ácidos docosa-hexaenoico e araquidônico (TINOCO et al., 2007). Sua concentração é variável conforme o estado de lactação, mais elevada no fim da mamada (leite posterior), sendo necessário o esvaziamento completo da mama para que o bebê receba um leite mais rico em gordura, importante para o desenvolvimento cerebral, adequado ganho de peso e sensação de saciedade (AKRÉ, 1997; GOUVEIA; LAMOUNIER; VIEIRA, 2009).

O leite materno contém ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, que são importantes no desenvolvimento do processo visual e da mielinização do cérebro (MIRANDA JÚNIOR; SILVA; SOARES, 2007; PICCIANO, 2001; TINOCO et al., 2007) e na proteção contra alergias e infecções (TINOCO et al., 2007). O ácido araquidônico e o ácido linoleico são gorduras poli-insaturadas importantes para a síntese de prostaglandinas, compostos envolvidos em uma série de funções biológicas que atuam sobre a digestão e a maturação de células intestinais. A dieta materna influencia a qualidade dos lipídios secretados no leite (TINOCO et al., 2007). Caso a dieta seja composta predominantemente de gordura animal, terá um aumento de ácidos graxos saturados; se balanceada com gordura vegetal, o ácido linoleico e seus derivados poli-insaturados estarão presentes em maior proporção. em mães cujas dietas são baseadas em carboidratos, haverá uma predominância de ácidos graxos de cadeias média e curta entre os constituintes do leite (GOUVEIA; LAMOUNIER; VIEIRA, 2009).

Em relação à gordura, a principal diferença entre os leites bovino e humano está na quantidade dos ácidos graxos saturados presentes na posição sn-2 dos triacilgliceróis. No leite bovino, os ácidos palmítico e esteárico estão igualmente distribuídos entre as posições sn-1,3 (34 e 10%, respectivamente) e sn-2 (32 e 10%, respectivamente). O leite humano tem mais ácido palmítico (58%) e menos ácido esteárico (3%) na posição sn-2, em contraste com suas quantidades nas posições sn-1,3 (16 e 15%, respectivamente) (KARUPAIAH, 2007).

O leite humano contém de 3 a 5% de lipídios, dentre os quais 98% são compostos por triacilgliceróis, 1,3% de fosfolipídios e 0,4% de colesterol. Os ácidos graxos representam 90% dos triacilgliceróis e 88% dos lipídios totais. A gordura do leite humano é a principal fonte de energia para o recém-nascido (aproximadamente 50% das calorias totais), é fonte de ácidos graxos essenciais, como os ácidos linoléico (C18:2 n-6) e alfa-linolênico (C18:3 n-3), e participa do transporte de vitaminas (A, D, E e K) e hormônios lipossolúveis (JENSEN, 1990).

2.2.3. Carboidrato

A lactose é o principal carboidrato do leite humano, mas encontram-se ainda, em pequenas quantidades frutose, galactose e outros oligossacarídeos. A lactose fornece 40% das necessidades energéticas. Esse dissacarídeo é metabolizado em glicose, que é uma fonte de energia, e em galactose, constituinte dos galactolipídios, substâncias importantes para o desenvolvimento do sistema nervoso central. Além disso, facilita a absorção de cálcio e ferro e promove a colonização intestinal com lactobacilos bífidos, bactérias que exercem efeito protetor no intestino, promovendo um meio ácido, através da fermentação, dificultando, assim, o crescimento de bactérias patogênicas, parasitas e fungos (AKRÉ, 1997; GOUVEIA; LAMOUNIER; VIEIRA, 2009; PICCIANO, 2001).

A lactose facilita a absorção de cálcio e ferro (GIOIELLE et al., 2009).

2.2.4. Vitaminas e Minerais

As concentrações de minerais e oligoelementos estão bem adaptadas às necessidades nutricionais e às capacidades metabólicas da criança. A relação cálcio/fósforo (2:1) no leite materno é fisiológica e facilita a absorção do cálcio no trato gastrointestinal. O ferro, apesar de estar presente em pequena quantidade (0,3mg/dL), tem alta biodisponibilidade. A maior acidez do trato intestinal na presença de quantidades adequadas de zinco, cobre e lactoferrina é fator importante que aumenta a absorção do ferro (GOUVEIA; LAMOUNIER; VIEIRA, 2009).

Cerca de 70% do ferro do leite materno são absorvidos, sendo rara a ocorrência de anemia ferropriva nos primeiros 6 meses de vida em crianças em aleitamento materno exclusivo. É importante destacar que a introdução precoce de alimentos em

crianças em aleitamento materno pode comprometer a absorção do ferro por mecanismo de quelação. Em adição, as quantidades de zinco, cobre, selênio, cobalto e flúor presentes no leite materno também atendem a todas as necessidades dos lactentes (GOUVEIA; LAMOUNIER; VIEIRA, 2009).

Desde que a mãe esteja em bom estado nutricional, o leite humano conterá todas as vitaminas necessárias à criança, em quantidades adequadas, com exceção apenas das vitaminas D e K, presentes em quantidades mais baixas. Por outro lado, vale salientar que, tanto no aleitamento materno quanto na administração do leite de vaca, pode haver carência vitamínica, ou por deficiência da mãe ou por perdas durante o processamento. Nestes casos, a suplementação vitamínica, em especial a da vitamina K, deve ser avaliada pelo neonatologista (ISSLER, 1991).

O conteúdo de vitamina A está presente em quantidade satisfatória no leite humano, sendo muito elevada no colostro. A vitamina D tem baixa concentração, contudo, a pele da criança nascida a termo, quando exposta ao sol, pode fabricar quantidade adequada dessa vitamina. As concentrações de vitamina E presentes no leite materno atendem às necessidades do lactente (GARCIAL et al., 2009), e a vitamina K está presente em maior quantidade no colostro e no leite posterior. Os recém-nascidos que não são amamentados nas primeiras horas de vida correm o risco de desenvolver doença hemorrágica, sendo recomendada a administração profilática de vitamina K imediatamente após o parto (GOUVEIA; LAMOUNIER; VIEIRA, 2009).

O conteúdo de vitaminas hidrossolúveis no leite materno reflete a ingestão da mãe. Relatos de deficiência são raros, mesmo entre mães desnutridas ou vegetarianas estritas. No entanto, atenção especial deve ser dada em locais onde a deficiência de algumas vitaminas é endêmica, como, por exemplo, a vitamina B₁ (tiamina), e também entre mulheres que usam anticoncepcionais orais por tempo prolongado, uma vez que podem apresentar níveis diminuídos de vitamina B₆ em seu leite (AKRÉ, 1997; GOUVEIA; LAMOUNIER; VIEIRA, 2009; PICCIANO, 2001;). A maneira mais eficiente para evitar qualquer deficiência vitamínica para o lactente é dar orientação às mães sobre como consumir uma dieta balanceada durante a lactação (AKRÉ, 1997; GOUVEIA; LAMOUNIER; VIEIRA, 2009). Desta forma, sugere-se que sejam incluídas nas ações de pré-natal medidas que promovam a modificação de práticas alimentares e qualidade da dieta como estratégia de combate à deficiência de micronutrientes, contribuindo para a redução dos níveis de morbimortalidade no binômio mãe-filho (MIRANDA JÚNIOR; SILVA; SOARES, 2007).

A concentração de beta-caroteno é mais elevada na fase do colostro. Acredita-se que possa representar para o recém-nascido um mecanismo de defesa, no início da vida, contra a toxicidade pelo oxigênio (GOEDHART et al., 1994).

O leite humano possui adequação perfeita em relação aos minerais. Sua concentração, três vezes mais baixa que no leite de vaca, não leva à sobrecarga renal de solutos e nem à retenção de metabólitos. A relação cálcio-fósforo no leite humano é de 2:1. A baixa concentração de ferro é comum ao leite humano e de vaca, sendo que o primeiro apresenta maior disponibilidade, pela presença da lactoferrina, de modo que a criança aleitada ao peito raramente desenvolve anemia até o 2º semestre de vida (BRASIL, 1998; FOMON, 1993; ISSLER, 1991; LONNERDAL, 2000).

Quanto ao selênio, tanto a concentração como a biodisponibilidade são maiores no leite humano, assegurando níveis séricos e retenção mais elevada aos lactentes amamentados ao seio (EUCLYDES, 1997).

A vitamina A é requerida continuamente pelo concepto durante a gestação. No entanto, estoques fetais desse micronutriente são habitualmente baixos ao nascimento, de modo que, para manter e acumular níveis orgânicos normais até que alimentos complementares forneçam suficientes quantidades adicionais de vitamina A, o recém-nascido passa a depender do leite materno, sobretudo o inicial (colostro), rico em vitamina A (WHO, 1997).

A vitamina A é um nutriente essencial, importante na produção do crescimento e desenvolvimento, na manutenção da integridade epitelial, na função imune e na reprodução (FAO/WHO, 2001). Baixos níveis séricos de vitamina A estão associados a alterações subclínicas, redução da mobilização do ferro, ou clínicas, tais como o aumento acentuado da morbimortalidade, principalmente por doenças infecciosas, retardo do crescimento, anemia e xeroftalmia, sobretudo em crianças menores de 5 anos (MCLAREN; FRIGG, 1999; SOMMER, 2002; SOMMER; DAVIDSON, 2002; VILLAMOR; FAWZI, 2005).

O incentivo à amamentação é uma das estratégias que integram o Pacto Nacional pela Redução da Mortalidade Materna e Neonatal. Isso se deve à comprovação dos benefícios do aleitamento para mães e bebês, reduzindo a incidência de câncer de mama e ovário nas mulheres, favorecendo o crescimento saudável do bebê e diminuindo a vulnerabilidade a várias doenças (SALVIANO, 2004).

Os leites humano e de vaca diferem entre si na quantidade e qualidade das proteínas, bem como nos teores de gorduras, hidratos de carbono, vitaminas e sais minerais (CALIL et al., 1992).

2.2.5. Aspecto imunológico e protetor

Do ponto de vista imunológico, o recém-nascido é bastante imaturo ao nascer. Recebe, através da passagem transplacentária de IgG materna, boa parte dos anticorpos circulantes. O colostro, e posteriormente o leite maduro, contém, em diferentes concentrações, fatores de proteção anti-infecciosa, que podem ser classificados em celulares e humorais (FACCHINI, 1996).

Em decorrência da imaturidade do sistema imune, o recém-nascido é mais vulnerável às infecções (KUNZ, 1999). Vários estudos têm demonstrado o efeito protetor do leite materno em comparação com o aleitamento artificial sobre a morbimortalidade infantil, decorrente de algumas doenças infecciosas, principalmente a diarreia (TOMA; REA, 2008).

As propriedades anti-infecciosas do leite materno manifestam-se através de componentes solúveis e celulares. Os componentes solúveis incluem as imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG, IgD e IgE), lisozima, lactoferrina, fator bífido, interferon e outras substâncias imunorreguladoras. Os celulares são os macrófagos, linfócitos, granulócitos, neutrófilos e células epiteliais. A concentração desses componentes é muito alta no colostro e diminui no leite maduro (AKRÉ, 1997; FIELD, 2005; XANTHOU, 2005).

As imunoglobulinas constituem a maior parte do conteúdo proteico do leite materno, onde a IgA secretora age ligando-se a microrganismos e macromoléculas, impedindo sua aderência às superfícies mucosas e evitando a adesão do patógeno ao epitélio (COSTA; GRASSI; VAZ, 2001). A lactoferrina é uma glicoproteína que se liga ao ferro, competindo com microrganismos ferro-dependentes; possui propriedades anti-inflamatórias e atividade bacteriostática contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* e *Pseudomonas aeruginosa* (COSTEGUERA, 1995; GRASSI; COSTA; VAZ, 2001).

Tem sido demonstrado ao longo do tempo que a flora bacteriana intestinal de bebês alimentados com leite humano é diferente da encontrada em bebês alimentados com fórmulas infantis. São dominantes nas fezes de bebês alimentados com leite

humano *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, enquanto que naqueles alimentados com fórmulas infantis predominam enterobactérias, como *Escherichia coli*, *Bacteroides* e *Staphylococcus*. Acredita-se que o baixo pH produzido pelos lactobacilos e bifidobactérias desencoraja a proliferação bacteriana, contribuindo para maior defesa contra infecções (LONNERDAL, 2000).

NOVAK et al. (2001) avaliaram a microbiota do colostro humano, visando caracterizá-lo como fonte natural de probióticos, detectando uma microbiota rica em bactérias lácticas que poderiam funcionar como probióticos, se proporcionados aos lactentes nos primeiros dias pós-parto.

A IgA secretória contida no leite humano exerce proteção contra infecções e reveste a mucosa do intestino delgado, bloqueando a aderência de patógenos potenciais às células epiteliais da mucosa intestinal, além de complexar com eles e facilitar sua eliminação (LOVEGROVE, 1994; OSKI, 1982).

2.3. Banco de Leite Humano

Os bancos de leite humano foram implantados no Brasil com o propósito de funcionar como “pronto-socorro dietético”, voltados para atender às situações especiais em que as fórmulas lácteas não apresentavam respostas adequadas, a exemplo da prematuridade, da alergia ao leite-de-vaca e outros distúrbios nutricionais do recém-nascido e do lactente (ALMEIDA, 1999). Limitavam-se à coleta e à distribuição de leite humano e nem sempre seguiam os critérios de prioridade clínica. Não havia também a preocupação de resgatar a lactação das mães dos receptores com ações de estímulo à amamentação (ACCIOLY, 2009).

Os resultados da política pública a favor do aleitamento materno no Brasil ocupam lugar de destaque no cenário internacional. O país é um dos poucos a ter conseguido, mediante implantação de ações estratégicas integradas, o feito de fazer frente ao marketing agressivo da indústria de leites para lactentes, e reverter a desastrosa tendência do desmame precoce. Entre as principais estratégias da política governamental se encontram os Bancos de Leite Humano (FERREIRA et al., 2011).

O banco de leite humano é um centro especializado responsável pela promoção do incentivo ao aleitamento materno e execução das atividades de coleta, processamento e controle de qualidade de colostro, leite de transição e leite maduro, para posterior

distribuição, sob prescrição de médico ou de nutricionista, a criança que dele necessita como fator de sobrevivência (ALMEIDA, 1999).

O Posto de Coleta de Leite Humano (PCLH) é uma unidade fixa ou móvel, intra ou extra-hospitalar, vinculada tecnicamente a um BLH e administrativamente a um serviço de saúde ou ao próprio banco. O PCLH é responsável por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno e execução de atividades de coleta da produção láctea da nutriz e sua estocagem, não podendo executar as atividades de processamento do leite, que são exclusivas do BLH (BRASIL, 2008).

As atividades realizadas em BLH podem ser divididas em dois grupos. O primeiro compreende as atividades médico-assistenciais: a) desenvolvimento de ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno, como programas de incentivo e sensibilização sobre a doação de leite humano; b) assistência à gestante, puérpera, nutriz e lactente na prática do aleitamento materno, com vista a preparação da gestante para a amamentação, orientação à puérpera e à nutriz sobre o cuidado com a mama puerperal, cuidados sobre a pega, posição e sucção ao amamentar e, ainda, orientações sobre ordenha, coleta, armazenamento e utilização do leite ordenhado no domicílio; c) execução das operações de controle clínico da doadora (BRASIL, 2006).

Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008), o segundo grupo compreende as atividades de tecnologia de alimentos, ou seja, aquelas inerentes ao processamento de leite humano e controle de qualidade:

- Coletar, selecionar, classificar, processar, estocar e distribuir o leite humano ordenhado e pasteurizado.
- Responder tecnicamente pelo processamento e controle de qualidade do leite humano ordenhado procedente do posto de coleta a ele vinculado.
- Realizar o controle de qualidade dos produtos e processos sob sua responsabilidade.
- Monitorar e registrar as etapas do processo.
- Dispor de sistema de informação que assegure os registros relacionados às doadoras, receptoras e produtos, disponíveis às autoridades competentes, guardando sigilo e privacidade dos mesmos.
- Estabelecer ações que permitam a rastreabilidade do leite humano ordenhado.

O leite humano ordenhado (LHO) é obtido através da manipulação cuidadosa da mama de forma manual ou mecânica (VINAGRE; DINIZ, 2001). O LHO apresenta grande capacidade de sorção (absorção e adsorção) de substâncias voláteis. Recomenda-se que nos ambientes onde acontece sua coleta e/ou manipulação não exista odores pronunciados, pois podem ser incorporados ao leite, alterando seu *flavor* original (BRASIL, 2001).

Todo leite humano recebido pelo BLH deverá ser submetido aos procedimentos de seleção e classificação. A seleção compreende: condições da embalagem, presença de sujidades, cor, *off-flavor* e acidez Dornic.

Off-flavor é o nome que se dá ao aparecimento de odores indesejáveis no LHO. É uma característica anormal decorrente de sua deterioração ou contaminação por substâncias exógenas, com perda da qualidade (APRILE; FEFERBAUM, 2011).

A detecção de *off-flavor* no momento da seleção e classificação do LHO no BLH é um eficiente instrumento capaz de indicar de forma rápida e segura a ocorrência de modificações físico-químicas como rancificação, proteólise e fermentação da lactose, e a fixação de substâncias voláteis. Essas modificações ocorrem em função do não cumprimento de boas práticas durante o processo de coleta, pré-estocagem e transporte (ALMEIDA; GUIMARÃES; NOVAK, 2005).

A avaliação da presença de sujidades deve ser realizada por analista capacitado, com o objetivo de determinar prováveis alterações que caracterizem o leite humano ordenhado como impróprio para consumo – leite que contenha corpo estranho no momento da avaliação (ALMEIDA, 1999; FIOCRUZ, 2003; SILVA, 2004).

A pasteurização do leite humano ordenhado conduzida a 62,5°C, por 30 minutos, é considerada uma pasteurização de leite e tem sido muito empregada. O tratamento é suave e dá origem a poucas modificações, em geral, a cor e o sabor permanecem invariáveis, bem como as proteínas, carboidratos e os lipídios, ocorrendo perda de até 25% dos fatores de proteção termossensíveis (ALAIS, 1985). Esse processo não visa à esterilização do LHO, mas uma inativação térmica de 100% dos microrganismos patogênicos passíveis de estarem presentes no leite, por contaminação primária ou secundária, além de inativar 99,99% da microbiota saprófita ou normal (APRILE, FEFERBAUM, 2011).

O LHO destinado ao consumo de recém-nascidos, particularmente os internados em unidades de terapia intensiva neonatal, não deve apresentar

microrganismos em quantidade ou qualidade capazes de representarem agravos a sua saúde (REDEBLH, 2008).

A qualidade do LHO pode ser avaliada sob diversos aspectos: nutricional, imunológico, microbiológico e físico-químico. Entretanto, na prática, os indicadores utilizados para avaliar a estabilidade da composição do LHO são os físico-químicos, dentre os quais se destaca a determinação da acidez (APRILE; FEFERBAUM, 2011).

Entre as causas de elevação da acidez do LHO está o crescimento de microrganismos, os quais por sua vez são incorporados aos produtos em função de técnicas inadequadas de coleta, higiene precária das doadoras e dos utensílios ou de problemas na cadeia de frio (APRILE, FEFERBAUM, 2011).

A acidificação desestabiliza as proteínas solúveis, as micelas de caseína, favorece a coagulação, aumenta a osmolaridade, gera *off-flavor* e reduz o valor imunológico desqualificando o produto para ser utilizado, uma vez que não poderá suprir as necessidades nutricionais de recém-nascidos prematuros, de baixo peso, ou com problemas imunológicos. Os carboidratos do LHO são transformados em ácido láctico, que se ioniza em meio aquoso, liberando prótons (H^+) que desestabilizam a caseína indisponibilizando o cálcio e o fósforo. Portanto, quanto maior a produção de ácido láctico no LHO, menor a biodisponibilidade de lactose, cálcio e fósforo (APRILE, FEFERBAUM, 2011).

Para a determinação da acidez titulável do leite humano, a solução titulante é o hidróxido de sódio 0,1 N, também conhecido como solução Dornic. Cada 0,01 mL gasto para neutralizar 1 mL de leite humano ordenhado corresponde a 1° D (um grau Dornic) (ALMEIDA, NOVAK, SANDOVAL, 1998; FIOCRUZ, 2003; SILVA, 2004).

O leite humano recém-ordenhado, caso titulado imediatamente após a ordenha, apresenta-se praticamente livre de ácido láctico, e sua acidez total pode ser considerada original, com valores oscilando entre 1 e 4° D. À medida que a microbiota encontra condições favoráveis para o crescimento, ocorre a produção de ácido láctico e a conseqüente elevação da acidez. Acidez maior ou igual a 8° D desqualifica o produto para o consumo. Mesmo apresentando valores inferiores a esse limite, a biodisponibilidade do cálcio e a osmolaridade variam de forma inversamente proporcional ao índice de acidez. A determinação da acidez Dornic também serve como parâmetro classificatório para o leite humano (ALMEIDA, NOVAK, SANDOVAL, 1998; FIOCRUZ, 2003; SILVA, 2004).

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

O leite humano reúne em sua composição mais de 250 substâncias diferentes, dispostas de modo hierarquizado e compartimentalizado, integrando três subsistemas ou frações: emulsão, suspensão e solução (ALMEIDA, 1999; FIOCRUZ, 2003; SILVA, 2004).

A fração emulsão congrega os constituintes lipossolúveis – gordura, óleos, vitaminas, pigmentos e alguns ácidos graxos livres. Praticamente todos os constituintes lipossolúveis, ou sua grande maioria, estão presentes na forma de glóbulos, envoltos por uma membrana fosfolipoprotéica. Essa membrana é a mesma da célula alveolar da glândula mamária, e é responsável pela estabilidade da emulsão (ALMEIDA, 1999; FIOCRUZ, 2003).

A fração suspensão é constituída de micelas de caseína, formadas por subfrações como a κ -caseína, γ -caseína, α -caseína, α s1-caseína, entre outras. O sistema caseína forma uma suspensão coloidal do tipo gel, cuja estabilidade é conferida pela fração κ -caseína que envolve a micela. A quase totalidade do cálcio e do fósforo presentes no leite humano encontra-se associada às micelas, partículas quimicamente ligadas às frações que as integram (ALMEIDA, 1999; FIOCRUZ, 2003; SILVA, 2004).

A fração solução reúne a água – o maior constituinte do leite humano (87%), bem como os demais hidrossolúveis (as proteínas do soro, os sais minerais e os carboidratos, por exemplo) e a maior parte dos imunobiológicos presentes no leite humano (ALMEIDA, 1999; FIOCRUZ, 2003; SILVA, 2004).

Como a fração de emulsão congrega os componentes de menor densidade, resultando em valor médio situado na ordem de $0,9\text{g/cm}^3$, ao se submeter o leite à centrifugação, a fração emulsão tende a ascender no tubo e separar-se dos demais constituintes. Ao término da centrifugação do LHO, previamente aquecido a 40°C , por 15 minutos, duas colunas poderão ser observadas: na parte superior dos tubos capilares fica a coluna de creme e na inferior a coluna de soro (APRILE, FEFERBAUM, 2011).

A avaliação do conteúdo calórico do LHO pode ser muito útil para resolver com eficácia situações do tipo: selecionar os melhores produtos para uso na alimentação dos receptores, com ou sem infecção (APRILE, FEFERBAUM, 2011).

O controle de qualidade microbiológico do leite humano ordenhado praticado pela Rede BLH-BR segue a lógica preconizada para alimentos, que institui a utilização de microrganismos indicadores de qualidade sanitária. Nesse contexto, o grupo

coliforme tem ocupado lugar de destaque, por ser de cultivo simples, economicamente viável e seguro, minimizando a possibilidade de resultados falso-negativos (ALMEIDA; NOVAK, 2002).

A partir do procedimento clássico para detecção de coliformes totais, foi desenvolvida uma metodologia alternativa que consiste na inoculação de quatro alíquotas de 1 mL cada de leite humano ordenhado pasteurizado, pipetadas de forma independente e inseridas em tubos com 10 mL de caldo bile verde brilhante, a 50 g/L (5% p/v), com tubos de Durham em seu interior. Após a inoculação e incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, a presença de gás no interior do tubo de Durham caracteriza resultado positivo. Os resultados positivos, por sua vez, devem ser confirmados com auxílio de alça bacteriológica calibrada de 0,05 mL, utilizando-se tubos contendo BGBL na concentração de 40 g/L (4% p/v). Após a incubação desses tubos sob as mesmas condições do teste inicial, a presença de gás indicando a existência de microrganismos do grupo coliforme confirma que o produto é impróprio para consumo (BRASIL, 2001; ALMEIDA, NOVAK, 2002; FIOCRUZ, 2003).

A metodologia alternativa e a clássica não diferem entre si, quando comparadas pelo teste de qui-quadrado ($p < 0,05$) (ALMEIDA; NOVAK, 2002).

Atualmente a Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (REDEBLH-BR) é considerada a maior e mais complexa do mundo, composta por 196 unidades operantes. A ação coordenada, a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico são os elementos mais importantes de sustentação (FERREIRA et al., 2011).

Em sua estrutura, a REDEBLH possui um Centro de Referência Nacional (BLH-IFF/ FIOCRUZ) e 28 referências estaduais/regionais, formalizadas em acordos de colaboração firmados entre a Fiocruz e as Secretarias Estaduais de Saúde (FERREIRA et al., 2011).

Após vários anos e com grandes investimentos em pesquisa e desenvolvimento tecnológico é possível observar o crescimento qualitativo e quantitativo da REDEBLH. O Centro de Referência Nacional desenvolveu metodologias de controle de qualidade tipicamente adaptadas às necessidades brasileiras, que são aplicadas à rotina de processamento e controle de qualidade do leite humano em todas as unidades da REDEBLH por apresentarem elevada confiabilidade e baixo custo. Como consequência desse esforço, surgiu o Programa Nacional de Qualidade em Bancos de Leite Humano (PNQBLH) (FERREIRA et al., 2011).

Mais recentemente foi criado o Programa de Proficiência em Bancos de Leite Humano, uma iniciativa que tem como objetivo a promoção de condições que permitam certificar a qualidade dos produtos e serviços, sob a responsabilidade dos Bancos de Leite Humano em todo país. O conteúdo técnico do Programa, elaboração e a operacionalização são de responsabilidade do Centro de Referência Nacional, em parceria com a Control Lab para o fornecimento do material necessário à realização dos testes de proficiência. A participação dos Bancos de Leite Humano nesse Programa significa um processo contínuo de melhoria, através do monitoramento do desempenho analítico, possibilitando, assim, a revisão constante de suas práticas (FERREIRA et al., 2011).

Segundo a REDEBLH (2014), no estado do Amazonas existem três Bancos de Leite Humano e nove postos de coleta sendo um desses postos localizado no interior do estado, município de Borba. O Banco de Leite Humano do Instituto da Mulher Dona Lindu está em funcionamento desde agosto de 2010, anexo ao Hospital Pronto Socorro 28 de Agosto.

Dados referentes ao período de janeiro até momento (REDEBLH, 2014), o volume em litros de leite humano (coletado e distribuído), o número de doadoras e de receptores de leite humano nos bancos de leite humano no estado do Amazonas e no Brasil estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Volume em litros de leite humano (coletado e distribuído); número de doadora e de receptor de leite humano nos bancos de leite humano no Amazonas e no Brasil.

Estado/Região	Leite Coletado	Leite Distribuído	Nº Doadoras	Nº Receptores
Amazonas	620,8	531,5	696	1.296
Brasil	68.759,6	54.083,8	59.932	65.923

FONTE: REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO (REDEBLH), 2014.

Considerando a inexistência de bancos de leite humano no interior do estado do Amazonas e o nascimento de crianças, inclusive prematuras ou que apresentem qualquer impossibilidade de serem amamentadas por causas que acometem o próprio lactente ou a mãe, é importante considerar uma alternativa de um alimento nutricional adequado e seguro para manter ou recuperar o estado nutricional dessas crianças nascidas nesses municípios.

2.4. Terapia Nutricional para o recém-nascido de baixo peso e prematuro

O aleitamento materno para os recém-nascidos de baixo peso (RNBP) apresenta dificuldades peculiares para a mãe e para o recém-nascido, assim como para o profissional de saúde durante a assistência pós-parto (XAVIER et al., 1991).

O leite materno é o alimento ideal para qualquer recém-nascido (RN) em função de sua digestibilidade, composição química balanceada e capacidade de gerar imunidade. Seu uso tem sido muito incentivado nas unidades de terapia intensiva (UTI) neonatal, incluindo tanto o leite extraído do seio materno e imediatamente administrado ao RN (leite humano cru) quanto o proveniente de banco de leite (leite humano processado) (VIEIRA et al., 2004).

O recém-nascido e o lactente são dotados de uma atividade anabólica intensa, dificilmente igualada em qualquer outro período de suas vidas. Isto é particularmente verdadeiro para o recém-nascido de baixo peso (CALIL et al., 1992).

Segundo a American Academy of Pediatrics & American College of Obstetricians and Gynecologists (2002), nas situações em que a mãe se encontra separada do seu bebê ou quando o bebê não é capaz de sugar o seio, a coleta e a estocagem do leite materno têm sido estimuladas.

O leite humano é uma mistura homogênea que supre as necessidades nutritivas, metabólicas e digestivas do RN a termo, além de fornecer hormônios, aminoácidos essenciais e fatores imunológicos, tornando-o a melhor escolha para a nutrição dos RN, especialmente os prematuros e os com doenças graves (SHANLER, 1995).

2.5. Liofilização

Liofilizar, segundo a definição seguida na Cátedra de Química Industrial da Faculdade Nacional de Farmácia, significa “desidratar uma solução congelada, impedindo seu descongelamento, enquanto se processa a evaporação; desse modo, a solução reduzida à massa gelada, “sublima” o próprio solvente e se transforma diretamente em substância seca” (EVANGELISTA, 2008).

A liofilização é uma operação de remoção da água por sublimação do gelo. Sendo a concentração da solução, em termos de sólidos solúveis, maior que 1%, o

produto seco terá o mesmo volume da solução o que permite obter-se produtos de baixa densidade aparente (FLINK; KAREL, 1983).

Durante o congelamento de uma solução a água transforma-se em gelo, num variado porém alto grau de pureza. Portanto, constituintes não aquosos são concentrados em uma pequena quantidade de água (PITOMBO, 1989).

A liofilização (freeze-drying) é empregada para a conservação de vários alimentos, permitindo o seu armazenamento por longo espaço de tempo. É um procedimento misto, em que se associam a congelação e a desidratação; sua inclusão entre os processos de frio se justifica não por assegurar o frio durante o período de conservação e sim pelo abaixamento da temperatura em que ocorre (EVANGELISTA, 2008).

Como este processo é realizado à temperatura baixa e na ausência de ar atmosférico, as propriedades químicas e organolépticas praticamente não são alteradas (GAVA, 1984).

A liofilização requer aparelhagem especial e alto vácuo. O processo é iniciado a partir do alimento congelado, seguido de sublimação. Após essa operação, o alimento fica inteiramente seco, com seu volume muito pouco diminuído e com suas características organolépticas e nutritivas quase intactas depois de sua reidratação (EVANGELISTA, 2008).

O “freezer-drying” é baseado na dessecação por sublimação do gelo à vácuo (EVANGELISTA, 2008).

Produtos liofilizados têm baixo peso, pois a maioria dos produtos naturais possui muita água, se conservam mesmo a temperatura ambiente e, quando reconstituídos retornam sua propriedades originais como nenhum outro produto desidratado (MARTINS et al., 2011).

2.6. Leite Humano Liofilizado

O uso da tecnologia da liofilização ou a desidratação a frio (*freeze dry*) é um processo confiável de conservação de produtos biológicos, sendo isento de conservantes ou produtos químicos (MARTINS et al., 2011).

Na liofilização o leite humano é congelado em temperaturas inferiores a -20°C e submetido à baixa pressão (alto vácuo), fazendo com que a água dos produtos que foi transformada em gelo, sublime, ou seja, passe diretamente do estado sólido para o gasoso. O resultado final é um produto com uma estrutura porosa livre de umidade e capaz de ser reconstituído pela simples adição de água (MARTINS et al., 2011).

Desta forma, os produtos liofilizados não sofrem alterações de tamanho, textura, cor, sabor, aroma, teor de vitaminas, sais minerais, proteínas, etc. e, quando conservados adequadamente, mesmo a temperatura ambiente, resiste intacto por muitos anos (MARTINS et al., 2011).

Em estudo realizado por Martins et al., 2011, o método de liofilização do leite humano mostrou-se viável, já que retirou com sucesso toda a água e manteve o produto sem alterar a composição química. Reduzindo a atividade de água, tornou-o um produto de baixo peso e com características sensoriais mantidas. Após o processamento, teor de lipídio, principal fonte calórico-energética, manteve-se próximo aos teores já descritos na literatura. Quanto às proteínas, não houve perdas. Verificou-se a permanência das imunoglobulinas IgA, da lactose e do cálcio.

2.7. Tempo de Vida Útil e Embalagem

A qualidade dos produtos alimentícios depende diretamente de fatores de natureza química, física e biológica, que atuam sobre o alimento durante o período de tempo entre sua produção e seu consumo, que é denominado vida-de-prateleira do alimento. Neste contexto, a embalagem é de importância fundamental (IAL, 1985).

Uma das principais funções da embalagem é entregar ao consumidor um alimento com o mesmo nível de qualidade dos produtos frescos ou recém-preparados, devido à sua capacidade de protegê-los contra agentes deteriorantes, infectantes e sujidades. Ela atua como uma barreira física de proteção para o produto contra o contato direto com o meio ambiente, evitando contaminações, manuseio inadequado, falta de higiene e perda das características próprias do produto (IAL, 1985).

Uma boa embalagem deve também ser resistente ao produto nela contido durante o processamento e/ou armazenamento, não cedendo elementos de sua composição ao alimento, sejam estes nocivos ou não ao homem ou ao próprio alimento (IAL, 1985).

O critério usado para garantir a segurança de produtos alimentícios embalados está relacionado com as interações embalagem/produto durante o período de tempo anterior ao uso final pelo consumidor (IAL, 1985).

A maioria dos testes efetuados em embalagens para alimentos são denominados provas de cessão ou testes de migração. Provas de cessão ou testes de migração são determinações cuja finalidade é avaliar a quantidade de substâncias passíveis de migrar da embalagem para o alimento. A importância destas determinações prende-se ao fato de que estes migrantes, além de potencialmente tóxicos ao homem, podem alterar as características do alimento (IAL, 1985).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Liofilização

Para o presente estudo, contamos com a doação de leite humano pasteurizado (colostro e leite maduro) do Banco de Leite Humano Fezinha Anzoategui do Instituto da Mulher Dona Lindu da cidade de Manaus/Amazonas.

O material foi transportado em caixa térmica, mantendo a temperatura de congelamento até o laboratório onde seriam realizadas as análises.

As amostras constituem-se de aproximadamente 600mL de colostro e 600 mL de leite maduro. No laboratório, o leite foi descongelado em banho-maria e porcionado em vidros menores. As amostras foram novamente congeladas (-20°C). Após o congelamento total, o material foi levado ao equipamento – liofilizador, onde permaneceu ligado por 72 horas. O resultado obtido foi a retirada da água do leite por sublimação. Para os procedimentos de análise de lipídios, proteínas, cinzas, umidade, vitamina A foram feitas triplicatas da amostra.

3.2. Determinação da Composição Centesimal

3.2.1. Proteína Total

A determinação de protídios baseou-se na determinação de nitrogênio pelo processo de digestão *Kjeldahl* (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Pesou-se quantitativamente em tubo de digestão semi-micro Kjeldahl aproximadamente 0,2g de amostra de leite humano liofilizado, enrolou-se em um pedaço de papel e colocou no tubo. Foi acrescentado 2g de mistura catalítica + 5 mL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) nos tubos. Passaram-se os tubos para o bloco digestor, aqueceu inicialmente a 50°C-100°C e aumentou a temperatura de 50°C a cada 15 minutos até atingir 350°/400°C, observando sempre o comportamento da amostra em função da sua composição. Digeriu-se até que o conteúdo dos tubos estivesse transparente, de cor verde-azulado e a partir daí aqueceu mais 30 minutos. Deixar esfriar os tubos e adicionar com cuidado aproximadamente 10 mL de água destilada por tubo.

Destilação: foi colocado o tubo com a amostra diluída no destilador, neutralizada com NaOH 50% (20mL); colocou-se o Erlenmeyer no destilador com 10 mL de ácido bórico e recolhido 100/150 mL do destilado.

Titulação: encheu-se a bureta de 50 mL com ácido clorídrico e titulou-se o destilado usando HCl 0,02 N até que o indicador virasse da cor azul para rosa clara.

Para o cálculo foram empregadas as seguintes fórmulas:

$$\%P = \% N \times \text{Fator de conversão (6,38)}$$

$$\% N = \frac{(V_a - V_b) \times N \times f \times 0.014 \times 100}{PA}$$

%P = Proteína total em matéria seca em porcentagem

%N = Nitrogênio total determinado em porcentagem

V_a = Volume de HCl gasto na titulação com a amostra.

V_b = Volume de HCl gasto na titulação do branco.

N = Normalidade de HCl

f = Fator da solução de HCl

PA = Peso da amostra

$$\%P_i = \%P / \text{FCU}$$

%P_i = Proteína integral na amostra em porcentagem

FCU = Fator de conversão de umidade

3.2.2. Lipídios

Avaliados pelo Método de Soxhlet (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Foram colocados os reboilers, previamente marcados, em estufa à 105°C durante 1 hora. Em seguida, levou-se ao dessecador por 30 min. Foi pesado e anotado o valor de cada um. Em seguida, pesou-se aproximadamente 2g da amostra e encapsulou-se no “berço de aço”, envolta em papel de filtro tampado com algodão, sem muita pressão. Foi medido aproximadamente 120 mL de éter de petróleo e adicionada essa quantidade a cada reboiler. Levou-se ao aparelho extrator de Soxhlet e deixado por 1 hora e 30 minutos. Lavou-se por refluxo por 30 min. Os reboilers foram levados para a estufa à 80°C por 15 min. Para evaporar o restante do solvente, foi levado ao dessecador por 30 minutos e pesado.

Para o cálculo foi empregada a seguinte fórmula:

$$(100 \times N)/P = \text{lipídios por cento p/p}$$

N= nº de gramas de lipídios (peso final – peso inicial do reboiler)

P= nº de gramas da amostra

3.2.3. Cinzas

Foram pesadas em balança analítica as cápsulas de porcelana, previamente aquecidas em mufla a 550°C e resfriada em dessecador até a temperatura ambiente. Pesou-se aproximadamente 1g de amostra seca em balança analítica. Colocou-se a cápsula em mufla pré-aquecida a 550 °C e deixou até que o resíduo se apresentasse a coloração cinza claro. Transferiu-se a cápsula para um dessecador, deixou-se esfriar por cerca de 20-30 minutos. O material foi pesado frio na balança analítica (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Para o cálculo foi utilizada a seguinte fórmula:

$$(100 \times N)/P = \text{cinzas por cento p/p}$$

N= nº de gramas de cinzas

P= nº de gramas da amostra

3.2.4. Carboidrato

O conteúdo de carboidratos foi dado como carboidratos totais pela diferença (somatório das porcentagens de umidade, proteínas, gordura e cinzas subtraídas de 100).

$$E = 100 - (A + B + C + D)$$

A = proteína total; B = lipídios; C = Umidade; D = cinzas

3.2.5. Umidade

Pesou-se aproximadamente 2 gramas de amostra em cápsula de porcelana na balança previamente tarada. O material foi aquecido durante 3 horas. Posteriormente o dessecador foi resfriado até a temperatura ambiente. A operação foi repetida até o peso constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Para o cálculo foi utilizado a seguinte fórmula:

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade}$$

P

N = nº de gramas de umidade (perda de massa em g)

P = nº de gramas da amostra

3.2.6. Vitamina A

Foram retiradas alíquotas de 5mL de colostro pasteurizado e leite maduro pasteurizado líquidos e as mesmas amostras da porção liofilizada, para análises em triplicata de retinol e β -caroteno mediante a técnica de *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)*, segundo Arnaud *et al.* (1991).

As alíquotas dos leites descongelados e homogeneizados foram colocadas em tubo Corex 25mL. As amostras foram suspensas em 750 μ L de butilato hidroxitolueno/etanol 0,1% e homogeneizadas por 15 segundos. Em seguida foi acrescentado 1mL de solução 50:50 de KOH – H₂O e homogeneizado por mais 15 segundos. A solução foi saponificada em banho-maria a 50°C, durante 60 minutos,

sendo que a cada 15 minutos as amostras eram agitadas por 15 segundos em Vortex. após a saponificação, o retinol foi extraído três vezes com hexano pureza HPLC.

O processo de extração consistiu na adição de 4,5mL de hexano, homogeneizado por 30 segundos e centrifugação por 3 minutos, para separação completa das fases.

O teor de retinol das amostras foi determinado em cromatógrafo. A identificação e a quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação com os tempos de retenção e as áreas dos respectivos padrões.

3.3. Análise Microbiológica

A análise microbiológica foi realizada pela técnica do número mais provável, de acordo com o descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (2002) e o Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (1997). As amostras foram de colostro e leite maduro não-lioofilizados e liofilizados.

As amostras (triplicatas) foram semeadas em tubos múltiplos com Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e encubadas por 48 horas.

3.4. Análise Sensorial e Prova de Reconstituição

Foram diluídas em 50 mL de água filtrada, aproximadamente 15 gramas de colostro e leite maduro liofilizados. Observou-se durante 12 horas se o produto manteve-se como leite fluido, isto é, estável sem precipitação (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

3.5. Tempo de Vida Útil e Embalagem

O leite humano liofilizado foi armazenado em embalagens de plástico transparente e em embalagem metálica (lata de alumínio) por um período de três meses. Durante esse período, o material foi armazenado sob refrigeração (4°C).

3.6. Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados utilizando técnicas estatísticas inferenciais e descritivas no tratamento das variáveis quantitativas e qualitativas. Empregou-se o teste de Tukey para duas amostras independentes e análise descritiva como média e desvio-padrão. Em todas as análises considerou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o programa Minitab, versão 16.0.

3.7. Aspectos Éticos da Pesquisa

Devido este projeto de pesquisa envolver material biológico de seres humanos, ele foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com Parecer Consubstanciado nº 473.358 e Certificado de Apreciação para Apreciação Ética (CAAE) sob número 18809913.3.0000.0006.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Leite Humano Liofilizado no Tempo Zero

Neste estudo, foi utilizado o processo de liofilização do colostro e do leite maduro (tempo 0). A liofilização é um processo de conservação do leite humano ordenhado que visa a retirada da água por sublimação, até a umidade final de 4 a 5% (BRASIL, 2006).

O leite humano ordenhado cru coletado e aprovado pelo banco de leite humano deve ser pasteurizado a 62,5°C por 30 minutos. O leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP) deve ser submetido à análise microbiológica para determinação da presença de microrganismos do grupo coliforme. O LHOP liofilizado e embalado a vácuo pode ser estocado em temperatura ambiente pelo período de 1 um ano (BRASIL, 2006).

O método de liofilização, que visa reduzir a atividade de água, torna este alimento um produto de baixo peso com características sensoriais mantidas. Para a reconstituição basta a simples adição de água (MARTINS, et al., 2011) .

As amostras de colostro e leite maduro utilizadas para as análises foram de doadoras de banco de leite, sem a preocupação de identificá-las e separá-las quanto ao estado nutricional materno, nível socioeconômico, horário da coleta do leite dentre outros fatores que podem interferir na concentração de nutrientes.

Figura 1: Liofilizador do Laboratório de Nutrição do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.



4.1.1. Colostro

O colostro, quando comparado ao leite maduro é mais viscoso, possuindo concentrações mais elevadas de proteínas, minerais e vitaminas lipossolúveis, particularmente A, E e carotenoides, bem como menores teores de lactose, gorduras e vitaminas do complexo B (ANDERSON, 1985; CASEY, et al., 1986). Seu conteúdo energético oscila ao redor de 58 kcal/100mL, em contraste com as 71 kcal/100mL existentes no leite maduro (ANDERSON, 1985, MAGY, 1949).

Os resultados referentes aos macronutrientes, umidade e cinzas do colostro pasteurizado e liofilizado estão mostrados na tabela 2. Nesse produto, o teor de lipídio, proteína e carboidrato correspondeu a 1,64g/dL, 1,70g/dL e 7,75g/dL, respectivamente. Os valores referentes à umidade e cinzas foram 4,02% e 0,23g/dL, respectivamente.

Tabela 2 – Médias dos teores de umidade, lipídio, proteína, carboidrato e cinzas, nas amostras de colostro liofilizado

Colostro Liofilizado				
Umidade (%)	Lipídio (g/dL)	Proteína (g/dL)	Carboidrato (g/dL)	Cinzas (g/dL)
4,02 ± 0,08	1,64 ± 0,02	1,70 ± 0,01	7,75 ± 0,30	0,23 ± 0,05

Os lipídios constituem a maior fonte de energia do leite humano. Seu conteúdo varia entre 3 e 4g/dL, correspondendo a, aproximadamente, 40 a 50% do total calórico. Já o colostro possui concentração menor, em torno de 1,8 a 2,9g/dL (CALIL et al., 1992). Segundo Jensen (1998), os lipídios são os componentes mais variáveis na composição do leite humano e sua quantidade pode variar em função do período de lactação (colostro e maduro), do período da mamada (diurno ou noturno) e ao longo de cada mamada (leite do início e do fim). As concentrações de ácidos graxos no leite humano são extremamente variáveis, de acordo com a quantidade e a qualidade dos lipídios ingeridos pelas nutrizes. Na vigência de uma dieta materna energeticamente equilibrada, a gordura do leite se assemelha àquela ingerida pela mãe (INSULL et al., 1959).

Pôde-se observar que a média dos teores de lipídio do colostro liofilizado diferiu dos valores encontrados na literatura (Figura 2). Comparados com Calil et al. (1992), Bortolozo et al. (2004) e da Silva et al. (2007), os valores apresentaram-se abaixo do esperado em 11,3%. Tal fato pode se explicado pelo tipo de alimentação ingerida pelas doadoras.

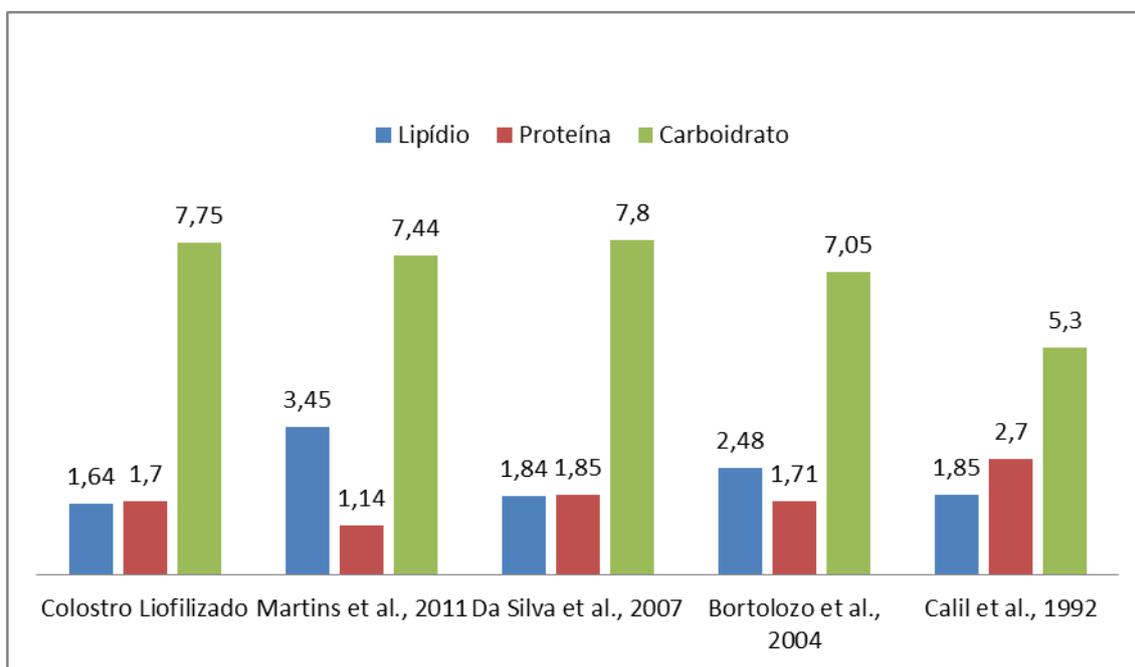


Figura 2: Comparação dos teores de lipídio, proteína e carboidrato do colostro liofilizado em comparação com outros estudos.

Cerca de 6 a 7% da energia do leite humano é fornecida através das proteínas nele encontradas, podendo ainda ser agrupadas em proteínas do soro e as caseínas

(TRAHMS, 2002). A necessidade proteica do recém-nascido a termo é estimada em cerca de 2,0 a 2,5 g/kg/dia, decrescendo gradualmente até chegar a 1,3kg/dia por volta do quarto mês (RÃIHÃ, 1985). O teor de proteína do colostro liofilizado encontrou-se dentro das faixas de valores observados por Bortolozo et al.(2004) e da Silva et al. (2007), o que indica que durante o processo de liofilização não houve perdas deste macronutriente.

A lactose é o principal carboidrato do leite humano, estando em concentrações mais baixas no colostro do que no leite maduro (CALIL et al., 1992), suprimindo cerca de 40% das necessidades energéticas do recém-nascido (TRAHMS, 2002). A média dos teores de carboidrato do colostro liofilizado está em concordância com a literatura (BORTOLOZO et al., 2004; DA SILVA et al., 2007; MARTINS, et al., 2011), permitindo sugerir que o processo de liofilização não produz perda considerável de carboidrato.

4.1.2. Leite Maduro

Os resultados referentes aos macronutrientes, umidade e cinzas do leite maduro pasteurizado e liofilizado estão mostrados na tabela 3. O teor de lipídio, proteína e carboidrato correspondeu a 1,74g/dL, 1,59g/dL e 7,84g/dL, respectivamente. Os valores referentes à umidade e cinzas foram 4,09% e 0,20g/dL, respectivamente.

Tabela 3 – Médias dos teores de umidade, lipídio, proteína, carboidrato e cinzas, nas amostras de leite maduro liofilizado.

Leite Maduro Liofilizado				
Umidade (%)	Lipídio (g/dL)	Proteína (g/dL)	Carboidrato (g/dL)	Cinzas (g/dL)
4,09 ± 0,05	1,74 ± 0,17	1,59 ± 0,17	7,84 ± 0,01	0,20 ± 0,07

Segundo as Dietary Reference Intakes (DRIs) para crianças de 0 a 6 meses é recomendada ingestão de 31g/dia de lipídio (IOM, 2000). Conforme demonstrado na Figura 3, os valores de lipídios descritos na literatura indicam valores superiores em relação ao leite maduro liofilizado (BORTOLOZO et al., 2004; CALIL, et al., 1992; MARTINS et al., 2011). Tal fato pode se explicado pelo tipo de alimentação ingerida pelas doadoras.

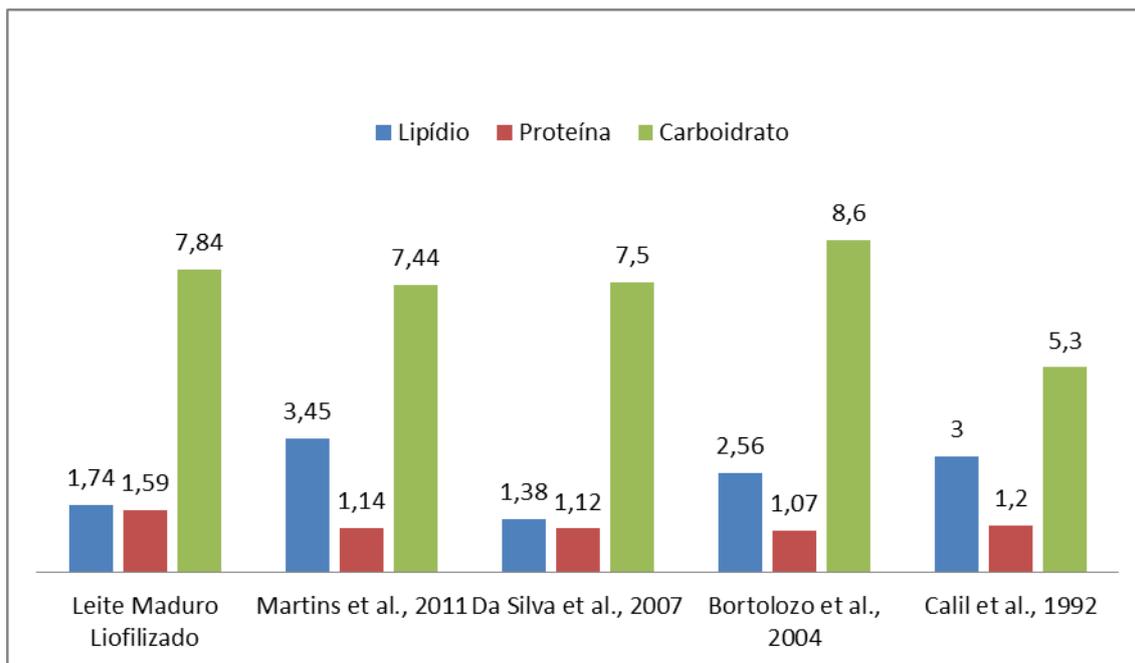


Figura 3: Comparação dos teores de lipídio, proteína e carboidrato do leite maduro liofilizado com outros estudos.

O teor de proteína do leite maduro liofilizado encontrava-se superior aos valores já observados (BORTOLOZO et al., 2004; CALIL, et al., 1992; DA SILVA et al., 2007; MARTINS, et al., 2011). Tal fato pode ser explicado pelo processo de liofilização que promove uma concentração desse macronutriente. O leite humano maduro fornece, em média, 1,2g de proteína para cada 100mL (RÃIHÃ, 1985). O ponto de corte utilizado para o cálculo da porcentagem de adequação de proteínas totais é de 11,7 g/L no leite maduro, segundo as DRI's para o cálculo da ingestão adequada (AI) para crianças com idade entre 0 e 6 meses (NAS, 2005) .

A média dos teores de carboidrato do leite maduro liofilizado está em concordância com a literatura (BORTOLOZO et al., 2004; CALIL, et al., 1992; DA SILVA et al., 2007; MARTINS, et al., 2011) permitindo sugerir que o processo de liofilização não produz perda considerável de carboidrato. Segundo as DRIs para crianças de 0 a 6 meses é indicado 60g/dia de carboidrato (IOM, 2000).

4.2. Armazenamento e Tipos de Embalagens

4.2.1. Colostro

O colostro liofilizado armazenado por três meses em embalagem plástica (Tabela 4) apresentou resultados referentes a lipídio, proteína e carboidrato de 1,62g/dL, 1,47g/dL e 7,94g/dL, respectivamente. Umidade de 4,32% e cinzas de 0,22g/dL. Os teores de lipídio, proteína e carboidrato presentes no colostro liofilizado armazenado por três meses em embalagem metálica foram de 1,63g/dL, 1,52g/dL e 7,99g/dL, respectivamente e estão relacionados na Tabela 4. Umidade 4,30% e cinzas 0,21g/dL.

Tabela 4 – Médias dos teores de umidade, lipídio, proteína, carboidrato e cinzas, nas amostras de colostro liofilizado armazenado em embalagens plástica e metálica por três meses.

Embalagem	Colostro Liofilizado				
	Umidade (%)	Lipídio (g/dL)	Proteína (g/dL)	Carboidrato (g/dL)	Cinzas (g/dL)
Plástica	4,32 ± 0,11 ^a	1,62 ± 0,50 ^a	1,47 ± 0,21 ^a	7,94 ± 0,06 ^a	0,22 ± 0,01 ^a
Metálica	4,30 ± 0,10 ^a	1,63 ± 0,45 ^a	1,52 ± 0,01 ^b	7,99 ± 0,56 ^a	0,21 ± 0,01 ^a

*Nas colunas, as letras iguais não diferem significativamente, Tukey, $p > 0,05$.

Na comparação entre os tipos de embalagem, não houve diferenças significativas dos teores de umidade, lipídio, carboidrato e cinzas do colostro liofilizado armazenado por três meses em embalagem metálica ou plástica.



Figura 4: Colostro liofilizado armazenado em embalagem plástica e metálica.

Porém, o teor de proteína apresentou diferença significativa, sugerindo que a embalagem metálica é uma melhor opção na conservação do colostro liofilizado em relação à preservação desse nutriente.

4.2.2. Leite Maduro

O leite maduro liofilizado armazenado por três meses em embalagem plástica (Tabela 5) apresentou resultados referentes a lipídio, proteína e carboidrato de 1,50g/dL, 1,42g/dL e 7,15g/dL, respectivamente. Umidade de 4,23% e cinzas de 0,19%. Os teores de lipídio, proteína e carboidrato presentes no leite maduro liofilizado armazenado por três meses em embalagem metálica foram de 1,69g/dL, 1,44g/dL e 7,10g/dL, respectivamente e estão relacionados na Tabela 5. Umidade de 4,28% e cinzas de 0,19g/dL.

Tabela 5 – Médias dos teores de umidade, lipídio, proteína, carboidrato e cinzas, nas amostras de leite maduro liofilizado armazenado em embalagens plástica e metálica por três meses.

Embalagem	Leite Maduro Liofilizado				
	Umidade (%)	Lipídio (g/dL)	Proteína (g/dL)	Carboidrato (g/dL)	Cinzas (g/dL)
Plástica	4,23 ± 0,01 ^a	1,50 ± 0,39 ^a	1,42 ± 0,11 ^a	7,15 ± 0,22 ^a	0,19 ± 0,05 ^a
Metálica	4,28 ± 0,29 ^a	1,69 ± 0,15 ^b	1,44 ± 0,08 ^a	7,10 ± 0,47 ^a	0,19 ± 0,05 ^a

*Nas colunas, as letras iguais não diferem significativamente, Tukey, $p > 0,05$.

Na comparação entre os tipos de embalagem, não houve diferenças significativas dos teores de umidade, proteína, carboidrato e cinzas do leite maduro liofilizado armazenado por três meses em embalagem metálica ou plástica.



Figura 5: Leite Maduro liofilizado armazenado em embalagem plástica e metálica.

Porém, o teor de lipídio apresentou diferença significativa, sugerindo que a embalagem metálica é uma melhor opção na conservação do leite maduro liofilizado em relação à preservação desse nutriente.

4.3. Vitamina A

O conteúdo nutricional do leite do BLH depende de dois fatores: composição do leite doado e efeito do processamento. Sua composição é relativamente constante, embora alguns nutrientes variem de maneira significativa ao longo da lactação, durante o dia e até mesmo ao longo de uma mesma mamada (NEVILLE et al., 2001). A vitamina A é um exemplo desses nutrientes, sofrendo influência do momento da mamada (RIBEIRO; DIMENSTEIN, 2004) e do estágio de lactação (MACIAS; SCHUWEIGERT, 2001). Esta vitamina se encontra no leite humano, principalmente na forma de palmitato de retinil, que é a forma éster desta vitamina.

De acordo com as DRIs, a ingestão recomendada de vitamina A para crianças de zero a seis meses de idade é de 400µg/dia e para os recém-nascidos pré-termo é de 400µg/dia. Valores em torno de 1µmol/L representa concentração mínima para atender as necessidades metabólicas dos lactentes, porém não permitem acumular reservas de vitamina A (IOM, 2000).

A concentração de vitamina A encontrada no colostro antes e após a liofilização foi 1,21µmol/L e 1,16µmol/L, respectivamente. Em relação ao leite maduro, foram encontrados os teores de 1,18µmol/L antes da liofilização e 1,14µmol/L após o processamento (Tabela 6). A secreção de vitamina A diminui no leite de transição em relação ao colostro, e se estabiliza no leite maduro ficando com as concentrações médias de 1,75 a 2,45 µmol/L em populações bem nutridas (IOM, 2000).

Tabela 6: Médias dos teores de vitamina A no colostro e no leite maduro antes e após o processo de liofilização.

	Vitamina A (µmol/L)	
	Colostro	Leite Maduro
Antes da liofilização	1,21 ± 0,10 ^a	1,18 ± 0,04 ^a
Após a liofilização	1,16 ± 0,04 ^b	1,14 ± 0,03 ^b

*Nas colunas, as letras diferentes diferem significativamente, Tukey, $p < 0,05$.

O descongelamento, a pasteurização e o congelamento são procedimentos que podem afetar diversos nutrientes presentes no leite humano (JENSEN, 1995).

A perda de vitamina A durante o processamento provavelmente é resultante da exposição dos frascos à luz durante o descongelamento e reenvase, já que a vitamina A é fotossensível e a técnica de processamento ocorreu em ambiente iluminado. Esses resultados sugerem a importância de proteger da luz o leite em frascos de vidro transparente, adotando medidas preventivas, como embalar os frascos com papel alumínio.

4.4. Prova da Reconstituição

Na análise sensorial e prova de reconstituição, foram verificadas as características quanto à reconstituição do leite liofilizado, entre elas a cor, a fluidez e aparência (Tabela 7).

No procedimento utilizado para reconstituição pôde-se verificar que a cor foi semelhante ao leite não-liofilizado, a fluidez continuou estável, semelhante ao leite não-liofilizado e a diluição foi plena, sem formação de precipitados.

Tabela 7: Teste de precipitação

Prova de Reconstituição	Característica
Cor	Semelhante ao leite não-liofilizado
Fluidez	Estável, Semelhante ao leite não-liofilizado
Diluição	Plena, sem formação de precipitados

4.5. Análise Microbiológica

Por definição, o grupo de coliformes totais inclui bactérias gram-negativas não esporuladas, fermentadoras de lactose, com produção de ácido e gás em faixa de temperatura que varia entre 32 e 37°C. Por sua vez, coliformes fecais constituem um subgrupo dos coliformes totais, cujo habitat natural é o trato intestinal dos animais homeotérmicos e que, do ponto de vista sanitário, funcionam como indicadores capazes

de evidenciar uma maior probabilidade de que o alimento tenha entrado em contato com material de origem fecal (TOWNSEND et al., 1998; JORDANO et al. 1995)

A presença de coliformes totais indica más condições higiênico-sanitárias (NOVAK; ALMEIDA, 2002). Segundo a resolução n.171 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2006), o leite humano ordenhado pasteurizado deve ser submetido a análise microbiológica para determinação da presença de microrganismos do grupo coliforme.

Como as amostras eram de colostro e leite maduro pasteurizado, as análises de coliformes totais foram negativas em todos os testes demonstrando que o processamento desses leites pelo banco de leite foi realizado de forma correta seguindo as boas práticas de manipulação de alimentos, configurando uma situação favorável para a saúde dos receptores desse alimento.

5. CONCLUSÃO

A liofilização do leite humano é ainda um processo pouco estudado e referenciado na literatura. De um modo geral, as análises demonstraram resultados positivos, já que a maior parte dos nutrientes estudados permaneceu no alimento após o processo de liofilização.

Este tipo de conservação aumenta a vida de prateleira do produto, reduz espaço de armazenamento e a reconstituição é de fácil execução e devolve as características do leite humano líquido. Tais benefícios facilitariam o fornecimento deste alimento para os municípios do interior do Estado do Amazonas e outras localidades do Brasil que não possuem banco de leite humano.

Sugere-se assim, a continuidade dos estudos neste campo, com aprofundamento nas propriedades nutricionais e na viabilidade econômica do processo, bem como a aplicabilidade da técnica aos bancos de leite humano.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, E.; SAUDERS, C.; LACERDA, E.M.A. Nutrição em obstetrícia e pediatria. 2.ed. – Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2009.

ADOLFO LUTZ: NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Métodos físico-químicos para Análise de Alimentos. Instituto Adolfo Lutz. Governo do Estado de São Paulo, 4.ed.;1.ed. digital, 2008.

AKRÉ, J. Alimentação Infantil: bases fisiológicas. IBFAN: São Paulo 1997; 16-21. Disponível em: www.ibfan.org.br/documentos/ibfan/doc - 288.pdf. Acessado em: 02 de janeiro de 2013.

ALMEIDA, J.A.G. Amamentação: um híbrido natureza cultura. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1999.

ALMEIDA, J.A.; GUILHERME, J.P.; MATTAR, M.J. Banco de Leite Humano. Sociedade Brasileira de Pediatria. Tratado de pediatria. 2 ed. Rio de Janeiro: Manole, 2009. p.401-9.

ALMEIDA, J.A.; GUIMARÃES, V. NOVAK, F.R. Determinação do off-flavor – Normas técnicas REDEBLHBR para bancos de leite humano. 2005. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br/media/seleclas.pdf>. Acessado em: 02 de janeiro de 2014.

ALMEIDA, J. A. G. NOVAK, F. R. SANDOVAL, M. H. Recomendaciones técnicas para los bancos de leche humana II: control de calidad. Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría, Caracas, v. 61, n.1, p.12-15, enero/marzo, 1998.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS & AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. Guidelines for perinatal care. 5th ed. New York: CV Mosby; 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington, DC: APHA; 2002.

ANDERSON, G.H. - Human milk feeding. *Ped.Clin.N.Am.* 32: 335, 1985.

ANDRADE, C. Aleitamento materno. In: Fontes JAC, organizador. *Manual de Perinatologia*. Salvador: Ed. Byk-Prociencx; 1981. p.18-29.

APRILE, M.M.; FEFERBAUM, R. Banco de Leite Humano. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

ARAÚJO, M.F.M. Situação e perspectivas do aleitamento materno no Brasil. In: Carvalho MR, Tamez RN. Amamentação: bases científicas a prática profissional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 1-3.

ARNAUD, J.; FORTIS, S.; BLACHIER, D.K.I.A., FAVIER, A. 1991. Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β etacarotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 572: 103-116.

AUGUSTO, R.A; SOUZA, J.M.P. Crescimento de crianças em aleitamento materno exclusivo no primeiro semestre de vida. Ver Bras Crescimento Desenv Hum 2007; 17(2):1-11.

BALABAN, G.A.P.; SILVA, G.A. Efeito protetor do leite materno contra obesidade. *Jornal de Pediatria*.vol. 80. n.1, 2004.

BALABAN, G.A.P.; SILVA, G.A.P.D; DIAS, M.L.C.D.M; DIAS, M.C.D.M; FORTALEZA, G.T.D.M; MOROTÓ, F.M.M; ROCHA, E.C.V. O aleitamento materno previne o sobrepeso na infância? *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil* , Recife, v. 4, n. 3, p. 263-8, jul./set., 2004.

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*. 2004;80(3):241-8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria MS 322/88. Normas para implantação e funcionamento de Bancos de Leite Humano. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 26 de maio de 1988.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa; 2008. p.124 - 161.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite Humano. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF; 5 set. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Recomendações Técnicas Para o Funcionamento de Bancos de Leite Humano. Brasília. 1998. 48 p.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Aleitamento materno. 2012. [acessado 2013 Jan 12]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Bancos de Leite Humano no Brasil. 2012. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=356>. Acesso em: 05 de janeiro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde; Organização Panamericana da Saúde. Guia alimentar para crianças menores de 2 anos. 2002. Disponível em <http://nutricao.saude.gov.br/documentos/guiaio.pdf>. Acesso em: 21 nov 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. D19. Prevalência de aleitamento materno. In: Indicadores de morbidade e fatores de risco. 2001a. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2001d19.pdf>. Acesso em: 05 de janeiro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde da Criança: nutrição infantil: aleitamento materno e alimentação complementar. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília (DF): Caderno de Atenção Básica 2009; 23(A): 112p.

BRASIL. Ministério da Saúde. D.20. Prevalência de aleitamento materno. In: Indicadores de morbidade e fatores de risco. 2001b. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2001d20.pdf>. Acesso em: 05 de janeiro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal/Ministério da Saúde, Secretaria de Ação à Saúde, Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009c. 108 p.: il. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).

CALIL, V. M.; LEONE, C. R.; RAMOS, J. L. Composição nutricional do colostro de mãe de recém-nascido de termo adequados para a idade gestacional. II – Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagem em relação ao leite de vaca. *Pediatria (São Paulo)*. 1992. v. 14. p. 14-23.

CARVALHO, M.R.; TAMEZ, R.N. Amamentação – bases científicas para a prática profissional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

CASEY, C.E. et al. – Nutrient intake by breastfed infants during the first five days after birth, *Am. J. Dis. Child.* 140: 933, 1986.

CHANTRY, C.J.; HOWARD, C.R.; AUINGER, P. Full Breastfeeding duration and associated decrease in respiratory tract infection in US children. *Pediatrics* 2006; 117:425-32.

CORTEGUERA, R.R. Valor imunológico de la leche materna. *Rev Cubana Pediatr* 1995;67.

DA SILVA, R.C.; ESCOBEDO, J. P.; QUINTAL, V. S.; IBIDI, S. M.; ALBUQUERQUE, E. M.; GIOIELLI, L. A.; *Quim. Nova* 2007, 30, 1535.

EUCLYPES, P.M. Nutrição do Lactente: base científica para uma alimentação adequada. In: EUCLYPES, P.M. Aleitamento Materno. Viçosa: Jard/Produções Gráficas, 1997. 46lp.

EVANGELISTA, J. Tecnologia de Alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 2008 p.390-392.

FACCHINI, F.P. Aleitamento Materno em Recém-nascidos com Internação Prolongada no pós-parto: Avaliação de um Programa de Estímulo. Campinas, 1996.119p. Tese de Doutorado em Medicina. Departamento de Medicina Interna. Universidade Estadual de Campinas.

FAO (Food and Agriculture Organization)/ WHO (World Health Organization). Vitamin A. In: FAO/WHO. Human vitamin and mineral requirements. Reporto of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Bangkok 2001; p. 87-107.

FERREIRA, S.L.C; NOVAK, F.R. Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano: passado, presente e futuro. IN: FERFEBAUN, R.; APRILE, M.M. Banco de Leite Humano. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. 166p. p.157-160.

FIELD, C.J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. J Nutr 2005; 135:1-4.

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

FOMON, S.J. Human milk and breast milk. In: FOMON, S.J. Nutrition of normal infants. St Louis: Mosby, 1993. p.409-23 , 530p.

GARCIA, L.R.S.; RIBEIRO, K.D.S.; ARAÚJO, K.F et al. Níveis de alfa-tocoferol no soro e leite materno de puérperas atendidas em maternidade pública de Natal, Rio Grande do Norte. Rev Bras Saude Matern Infant 2009; 9:423-8.

GAVA, A.J. Princípios de Tecnologia de Alimentos. São Paulo: Nobel, 1984.p 197.

GIOIELLE, L.A.; SILVA, R.C. Lipídeos Estruturados: alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano. Quim. Nova, Vol. 32, No. 5, 1253-1261, 2009.

GOEDHART, A.C.; BINDELS, J.G. The Composition of human milk as a model for the design of infant formulas: Recent findings and possible applications. Nutr. Res., [S.I],v.7, n.1, p.1-23, 1994.

GRASSI, M.S.; COSTA, M.T.Z.; VAZ, F.A.C. Fatores imunológicos do leite materno. Pediatria 2001; 23:258-63.

GUYTON, A.C. Fisiologia humana. Tradução; Charles Alfred Esberard. - [Reimpr.]. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.

INSULL, W. et al. The fatty acids of human milk. II. Alterations produced by manipulation of caloric balance and exchange of dietary fats. J. Clin. Invest. 38: 443, 1959.

ISSLER H.O. Aleitamento Materno e a Nutrição da Criança. IN: CARRAZZA, F.R.; MARCONDES, E. Nutrição Clínica em Pediatria. São Paulo: Sarvier, 1991.320p. p.125-130.

JENSEN, R.G.; Lipid Technology. 1998. v. 3. p. 34.

JENSEN, R.G. Miscellaneous factors affecting composition and volume of human and bovine milks. In: Jensen, R.G., editor. Handbook of milk composition. San Diego: Academic Press; 1995. p. 237.

JENSEN, R.G.; FERRIS, A. M.; LAMMI-KEFFE, C. J.; HENDERSON, R. A.; J. Dairy Sci. 1990, 73, 223.

JORDANO, R.; LOPEZ, C.; RODRIGUEZ, V; CORDOBA, G.;MEDINA, L. M.; BARRIOS, J. Comparison of Petrifilm method to conventional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms, *Escherichia coli* and yeasts and molds in foods. Acta Microbiologic Immunologic Hung 1995. v. 42. p. 255-259.

KAREL, M. FLINK, J.M. Some recent developments in food dehydration research. In A. S. Mujundar, Advances in drying. Hemisphere Publishin Corporation, vol. 3, p. 103-152 (1983).

KARUPAIAH, T., SUNDRAM, K.; Nutr. Met. 2007, 4, 1.

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 2009;55-71.

LAURINDO, V.M.; CALIL, T.; LEONE, C.R.; RAMOS, J.L. Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II - Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca. Revisões e Ensaio. p.14-23, 1992.

LEVY-COSTA, R.B; MONTEIRO, C.A. Cow's milk consumption and childhood anemia in the city os São Paulo, southern Brazil. Rev Saúde Pública 2004; 38:797-803.

LONNERDAL, B. Breast Milk: A Truly Functional Food. Nutrition, California. v. 16, n.7-8, p.509-511, 2000.

LOVEGROVE, J.A.; MORGAN, S.A. Feto-maternal interaction of antibody and antigen transfer, immunity and allergy development. Nut. Res., [S.l], v.7, n.1, p.25-42, 1994.

MACIAS, C.; SCHUWEIGERT, F.J. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. Ann. Nutr. Metab. 2001. v.45. p. 82-85.

MAGY, I.G. Composition of human colostrum and milk. Am. J. Dis. Child. v. 78. p. 589, 1949.

MARQUES, R.F.S.V.; LOPES, F.A, BRAGA, J.A.P. O crescimento de crianças alimentadas com leite materno exclusivo nos primeiros seis meses de vida. J Pediatr (Rio J)2004; 80:99-105.

MARTINS, E.C.; LEONARDI, R.R.; OLIVEIRA, C.R.; MATSUMOTO, F.M.T. Liofilização como Alternativa para Conservação do Leite Humano. *J Health Sci Inst.* 2011; 29(2):119-22.

MCLAREN, D.S.; FRIGG, M. Manual de ver y vivir sobre los transtornos por deficiencia de vitamina A (VADD). Washington: O.P.S., 1999.

MORGANO, M.A.; SOUZA L.A.; NETO J.M.; RONDÓ P.H.C. Composição Mineral do Leite Materno de Bancos de Leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 25(4): 819-824, out.-dez. 2005.

MOURA, E.C. Nutrição. In: Carvalho MR, Tamez RN. Amamentação: bases científicas a prática profissional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 60-1.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS), Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Dietary Reference Intake for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids (micronutrients), 2005, Cap. 4: 82-161. Disponível em: <http://fnic.nal.usda.gov/nal-display/index.php>. Acesso em 20 de maio de 2014.

NEVILLE, M.C.; MORTON, J.; UMEMURA, S. Lactogenesis. The transition from pregnancy to lactation. *Pediatric Clinic North America.* 2001. v. 48. p. 35-52.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.; SILVA, G.O; BORBA, L.M. Colostra humano: fonte natural de probióticos? *J. Pediatria, Porto Alegre*, v.77, n.4, p. 265-270, 2001.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G. Teste alternativo para a detecção de coliformes em leite humano ordenhado. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 587-591, maio/ jun. 2002.

OLIVEIRA, J.E.D; MARCHINI, J.S. Ciências Nutricionais: aprendendo a aprender. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2008.

OLIVEIRA, M.I.C. et al. Promoção, proteção e apoio à amamentação na atenção primária à saúde no Estado do Rio de Janeiro, Brasil: uma política de saúde pública baseada em evidências *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro; nov-dez, 2005;21(6):1901-10.

OMS. Amamentação e Medicação Materna: Recomendações sobre drogas da 8ª Lista Básica de Medicamentos da OMS. Organização Mundial da Saúde. São Paulo: Instituto de Saúde: IBFAN. Brasil; 1996.

OMS/UNICEF. Proteção, promoção e apoio ao aleitamento materno: o papel especial dos serviços materno-infantis. Genebra: WHO; 1989.

OPAS. Organização Panamericana de Saúde. Representação Sanitária Pan-Americana, Escritório Regional da Organização Mundial da Saúde. Amamentação. Disponível em: <http://www.opas.org.br/mostrant.cfm?codigodest=30>. Acesso em 21 nov 2013.

OSKI, F.A. The nonnutritional benefits of human milk. In: LIFSHITZ, F. *Pediatric Nutrition: Infant feedings deficiencies diseases*, St. Louis : Marcel Dekker, 1982. 342p.

PICCIANO, M.F. Nutrient composition of human milk. *Breastfeeding 2001: Part I: the evidence for breastfeeding*. *Pediatric Clinics of North America* 2001; 48:53-67.

PONS, S. M.; BARGALLÓ, A. C.; FOLGOSO, C. C.; SABATER, M. C. L.; *Eur. J. Clin. Nutr.* 2000, 54, 878.

PRENTICE, A. *Handbook of milk composition*; Jensen, R. G., ed.; Academic Press: New York, 1995, p. 115-221.

RÄIHÄ, N. Quantity and quality of milk protein intake: metabolic responses in the neonate. *Klin. Pædiatr.* 197: 176, 1985.

REDE BLH-BR. Livro de Atividades – Curso de educação permanente em aleitamento materno e bancos de leite humano – Módulo 2. Brasília: REDE BLH-BR, 2008.

REGO, J.D. Aleitamento materno. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 518.

REZENDE, J.; MONTENEGRO, C.A.B. Mamas. Lactação. In: Rezende J, organizador. *Obstetrícia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.400-403.

ROYER, P. - Breast-feeding and biological development. *Acta Paediatr. Scand.* 67: 554, 1978.

SALVIANO, S. 2004. Importância do hábito de amamentar. *Revista de Nutrição*, 67: 8.

SHANLER, R.J. Suitability of human milk for the low-birthweight infant. *Clin Perinatol.* 1995;22:207-22.

SILVA, D.R.B.; MIRANDA JÚNIOR, P.F.; SOARES, E.A. A importância dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa na gestação e lactação. *Rev Bras Saúde Matern Infant* 2007;7:123-33.

SILVA, I.A. Enfermagem aleitamento materno: combinando práticas seculares. *Rev Esc Enferm USP.* 2000;34:362-9.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela; 1997.

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

SIQUEIRA, R. S. de; MONTEIRO, C. A.. Amamentação na infância e Obesidade na idade escolar em famílias de alto nível socioeconômico. *Revista Saúde Pública*. São Paulo, v. 41, n. 5, p. 12, 2007.

SOMMER, A. La carência de vitamina A y sus consecuencias. Guia práctica para la detección y el tratamiento. Ginebra: OMS, 1995.

SOMMER, A.; DAVIDSON, R.F. Assessment and control of vitamin A deficiency: the Annecy accords. *J. Nutr.* 2002; 132:284S-50S.

SPINELLI, M.G.N.; MARCHIONI, D.M.L, SOUZA, S.B.; SZARFARC, S.C. Fatores de risco para anemia em crianças de 6 a 12 meses no Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 2005; 17:84-91.

TERESA NETO, M. Aleitamento materno e infecção ou da importância do mesmo na sua prevenção. *Act Pediatr Port. Lisboa*, v. 37, n. 1, p. 23-26, 2006.

TINOCO, S.M.B.; SICHIERI, R.; MOURA, A.S.; SANTOS, F.S.; CARMO, M.G.T. Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos trans do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. *Card Saúde Pública* 2007; 23:525-34.

TOMA, T.S.; REA, M.F. Benefícios da amamentação para a saúde da mulher e da criança: um ensaio sobre as evidências. *Cad Saúde Pública* 2008; 24:S235-S246.

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. *J Food Prot* 1998. v. 61. p. 444-449

TRAHMS, C.M. Nutrição na lactância. In: MAHAN, L.K.; STUMP, S.E. Alimentos, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Roca; 2002. p. 187-204.

TRINDADE C.E.P. Necessidades nutricionais e alimentares dos recém nascidos de termo e pré-termo. In: Faculdade de Medicina de Botucatu. Departamento de Pediatria. *Condutas em Pediatria*. Rio de Janeiro: EPUB; 1999. p.110-121.

VASCONCELOS, M.G.L.; LIRA, P.I.C.; LIMA, M.C. Duração e fatores associados ao aleitamento materno em crianças menores de 24 meses de idade no estado de Pernambuco. *Ver Bras Saúde Matern Infant* 2006; 6:99-105.

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.; MOREIRA, M.E.L; ROCHA, A.D.; PIMENTA, H.P.; LUCENA, S.L. Análise do conteúdo energético do leite humano administrado a recém-nascidos de muito baixo peso ao nascimento. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:490-4.

VIEIRA, G.O.; SILVA, L.R.; VIEIRA, T.O.; ALMEIDA, J.A.G.; CABRAL, V.A. Hábitos alimentares de crianças menores de um ano amamentadas e não amamentadas. *J Pediatr* 2004; 80:411-416.

VILLAMOR, E.; FAWZI, W. W. Effects of vitamin A supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. *Clin. Microbiol Rev.* 2005; v. 18 p.446-64.

VINAGRE, R.D; DINIZ, E.M. O leite humano e sua importância na nutrição do recém-nascido prematuro. São Paulo: Atheneu; 2001.

VITTOLO, M.R. Nutrição: da gestação ao envelhecimento. Rio de Janeiro: Ed. Rubio, 2008.

XANTHOU, M. Immune protection of human milk. Biol Neonate 1998; 74:121-33.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, UNICEF, IVACG Task Force. Vitamin A supplements: a guide to their use in the treatment and prevention of vitamin A deficiency and xerophthalmia. 2.ed. Geneva; 1997.

WORTHINGTON-ROBERTS, B; WILLIAMS, S.R. Nutrition in Pregnancy and Lactation 6 ed. New York: WCB Mc Graw Hill; 1997. p. 51.