

ELIANA APARECIDA FAGUNDES QUEIROZ BORTOLOZO

**ANÁLISE NUTRICIONAL DO LEITE HUMANO PROCESSADO
EM BANCO DE LEITE E DESENVOLVIMENTO DE UM
SUPLEMENTO QUE ATENDA ÀS NECESSIDADES
ESPECÍFICAS DO RECÉM-NASCIDO
DE BAIXO PESO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:
Prof.^ª Dr.^ª Lys Mary B. Cândido

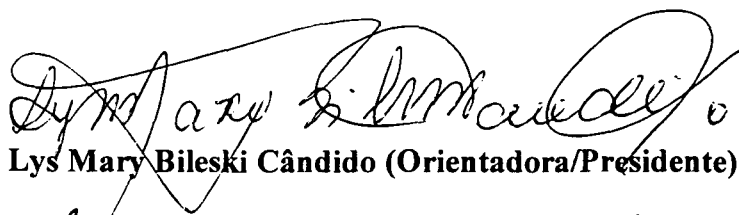
CURITIBA
2002

“Análise nutricional do leite humano processado em banco de leite e desenvolvimento de um suplemento que atenda às necessidades específicas do recém-nascido de baixo peso”.

por

***Eliana Aparecida Fagundes
Queiroz Bortolozo***

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de mestre no Curso de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela Comissão
formada pelos Professores



Prof.^ª. Dr.^ª. Lys Mary Bileski Cândido (Orientadora/Presidente)



Prof.^ª. Dr.^ª. Luciana Maria Borba (Titular/UEPG)



Prof.^ª. Dr.^ª. Mayumi Elisa Sato (Titular/UFPR)

Curitiba, 22 de fevereiro de 2002

Para meu querido amigo e marido Paulo e meus amados filhos Tiago e Larissa, pelo carinho e compreensão em tantos momentos de ausência.

Ao meu pai Geraldo, pelas infinitas vezes que me ajudou e apoiou, e a minha mãe Vanda, por ter-me auxiliado tanto e principalmente por ter sido muitas vezes a mãe de meus filhos.

Para meu sobrinho e amigo Juliano, que participou ativamente desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por oferecer-me tantos amigos nesta minha jornada. Entre tantos que estiveram ao meu lado, gostaria de agradecer em especial:

À minha orientadora Lys Mary, pelo incentivo e pela forma competente e carinhosa com que me orientou.

A todos os professores do curso da pós-graduação, pelo que me transmitiram, pelo incentivo e apoio, em especial ao professor Obdulio G. Miguel e à professora Mayumi E.O. Sato.

Ao professor Geraldo Picheth, pela gentileza em liberar o uso de equipamentos do laboratório de análise de Bioquímica Clínica.

À professora e colega Shirley R. Utiyama, por ter-me auxiliado nas análises de IgA.

A todos os funcionários e técnicos do curso de Farmácia e Nutrição, em especial à funcionária Regina C.M. de Andrade, pela simpatia e eficiência, e aos técnicos Jair José de Lima e Lindamir T. Túlio, pela competente colaboração.

A todos os colegas do curso de pós-graduação, em especial a Deise R. Mendonça, pelo carinho e amizade.

À minha amiga Simone Busato, pela companhia e apoio.

À direção e colegas do CEFET, pelo apoio e colaboração. Em especial, agradeço às amigas Maria Helene e Denise, que auxiliaram nas minhas aulas de Nutrição, e a Giovana, pelo incentivo nas análises microbiológicas.

À equipe do laboratório de estatística da UFPR: professor Benito, Waldemir e Waldemar, que me assessoraram nas análises estatísticas.

Ao professor Gabriel Guimarães, diretor do CEPPA, e a Emilliana Tiboni, pelas análises dos minerais.

À professora Luiza M. Cortez (PUC-PR), pelas análises de atividade de água.

A todos os funcionários dos Bancos de Leite do Hospital de Clínicas da UFPR e do Hospital da Criança de Ponta Grossa. Em especial a Eslair e Raquel, não só pelas amostras de leite fornecidas, mas principalmente pela forma atenciosa como sempre me atenderam.

A todas as doadoras de leite e a seus filhos, cuja colaboração, mesmo anônima, foi fundamental para a execução deste trabalho.

À minha amiga Rilka, pela amizade e apoio, e por ter sido tantas vezes "motorista" de meus filhos.

Aos meus irmãos Jone e William, pelo valioso apoio e auxílio.

Ao meu irmão "Gude", que participou intensivamente desta conquista.

A minha cunhada Adélia, pelos almoços e lanches a toda hora... e pela presença amiga de todos os que eu amo e que estiveram ao meu lado...

Obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA	3
1.2 OBJETIVOS.....	4
1.2.1 Objetivos Gerais.....	4
1.2.2 Objetivos Específicos.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 LEITE HUMANO	6
2.1.1 Proteínas	9
2.1.2 Gordura.....	11
2.1.3 Carboidratos.....	13
2.1.4 Vitaminas e Minerais	13
2.1.5 Aspecto imunológico e protetor.....	14
2.2 TERAPIA NUTRICIONAL PARA O RECÉM-NASCIDO DE BAIXO PESO.....	19
2.2.1 Diferenças na Composição do Leite Humano	27
2.2.2 Suplementação do Leite Humano	32
2.3 BANCO DE LEITE HUMANO.....	37
2.4 MODIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS DE PROTEÍNAS: HIDROLISADOS.....	39
2.5. EFEITOS DA FORTIFICAÇÃO DO LEITE HUMANO	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES.....	43
3.1.1 Matéria-prima e Reagentes utilizados na Fase da Avaliação do Perfil Nutricional e Microbiológico	43
3.1.1.1 Matéria-prima	43
3.1.1.2 Equipamentos.....	44
3.1.1.3 Reagentes e soluções.....	44
3.1.2 Material e Reagentes utilizados na Fase do Desenvolvimento do Suplemento	45
3.1.2.1 Matéria-prima	45
3.1.2.2 Equipamentos e materiais:.....	45
3.2 METODOLOGIA	45
3.2.1 Acompanhamento das Atividades de Produção de Leite em Banco de Leite	45
3.2.2 Análise de Macronutrientes:.....	45
3.2.2.1 Lipídios totais:	45
3.2.2.2 Proteínas	47
3.2.2.3 Lactose.....	48
3.2.2.4 Calorias:.....	48
3.2.3 Análise de Minerais.....	49
3.2.3.1 Fósforo.....	49
3.2.3.2 Cálcio, Potássio, Sódio, Zinco, Magnésio.....	49
3.2.3.3 Preparação das amostras.....	49
3.2.4 Análise Microbiológica	50
3.2.4.1 Contagem de Aeróbios Mesófilos viáveis/mL.....	51
3.2.4.2 Grupo Coliformes	51
3.2.4.3 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva:	52

3.2.4.4 <i>Salmonella</i>	53
3.2.5 Análise de Imunoglobulina A (IgA)	53
3.2.6 Análise da Atividade de Água	54
3.2.7 Estatística das Análises dos Macro e Micronutrientes	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1 ACOMPANHAMENTO DAS ATIVIDADES DE PRODUÇÃO DE LEITE EM BANCO DE LEITE	55
4.1.1 Seleção de Doadoras	55
4.1.2 Coleta	56
4.1.3 Armazenamento e Transporte	57
4.1.4 Processamento e controle de qualidade.....	57
4.2 ANÁLISES DOS MACRONUTRIENTES	61
4.2.1 Estatísticas Descritivas	61
4.2.2 Análise de Variância	64
4.2.3 Teste de Comparações Múltiplas (Tukey).....	65
4.2.4 Verificação das Pressuposições da ANOVA.....	66
4.3 ANÁLISES DOS MICRONUTRIENTES	66
4.3.1 Estatísticas Descritivas	66
4.3.2. Análise de Variância (ANOVA).....	69
4.3.3 Teste de Comparações Múltiplas (Tukey).....	70
4.3.4 Verificação dos Pressupostos da ANOVA	70
4.3.5 Teste de Kruskal-Wallis	71
4.3.6 Teste de Comparações Múltiplas (d.m.s.)	71
4.3.7 Coeficiente de Variação	72
4.4 ADEQUAÇÃO DOS MACRONUTRIENTES.....	72
4.5 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS BUTIRÔMETRO E CREMATÓCRITO PARA ANÁLISE DE GORDURA NO LEITE	77
4.6 ADEQUAÇÃO DOS MINERAIS.....	79
4.7 ANÁLISE DO PADRÃO MICROBIOLÓGICO	82
4.8 DESENVOLVIMENTO DE UM SUPLEMENTO PROTÉICO E DE MINERAIS:.....	85
4.8.1 Avaliação da Adição do Suplemento na Qualidade Microbiológica do Leite	94
4.8.2 Avaliação da Adição do Suplemento no Total de IgA do Leite Humano.....	94
4.8.3 Análise da Atividade da Água do Suplemento	94
5 CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
APÊNDICES	112

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO PROTÉICA DOS LEITES HUMANO E DE VACA.....	10
TABELA 2 - BENEFÍCIOS IMUNES DO LEITE HUMANO	16
TABELA 3 - EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO, DO CONGELAMENTO E DO DESCONGELAMENTO SOBRE OS COMPONENTES PROTETORES DO LEITE HUMANO (% DE REDUÇÃO).....	18
TABELA 4 - NECESSIDADES NUTRICIONAIS DIÁRIAS PARA RECÉM-NASCIDOS DE BAIXO PESO	26
TABELA 5 - FATORES QUE INFLUENCIAM AS MODIFICAÇÕES DA QUALIDADE DO LEITE HUMANO	30
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DE LEITE MATERNO TERMO E PRÉ-TERMO DURANTE OS 30 PRIMEIROS DIAS DE LACTAÇÃO E DE FORTIFICANTES DO LEITE HUMANO (PREPARADOS PARA 100ML DE LEITE)	31
TABELA 7 - PARÂMETROS INSTRUMENTAIS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE MINERAIS.....	50
TABELA 8 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL LACTOSE	61
TABELA 9 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL PROTEÍNAS	62
TABELA 10 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL LIPÍDIOS	62
TABELA 11 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL CALORIAS	63
TABELA 12 - ANOVA DE LACTOSE.....	64
TABELA 13 - ANOVA DE PROTEÍNA	64
TABELA 14 - ANOVA DE LIPÍDIOS	64
TABELA 15 - ANOVA DE CALORIAS.....	64
TABELA 16 - TESTE DE TUKEY PARA LACTOSE.....	65
TABELA 17 - TESTE DE TUKEY PARA PROTEÍNAS.....	65
TABELA 18 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL CÁLCIO	68
TABELA 19 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL MAGNÉSIO	68
TABELA 20 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL POTÁSSIO	68
TABELA 21 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL SÓDIO	69
TABELA 22 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL ZINCO	69
TABELA 23 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL FÓSFORO.....	69
TABELA 24 - ANOVA SÓDIO	69
TABELA 25 - ANOVA POTÁSSIO.....	70
TABELA 26 - TESTE DE TUKEY (95%) PARA SÓDIO.....	70
TABELA 27 - RESULTADO DO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS	71
TABELA 28 - RESULTADO DO TESTE DE COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS.....	71
TABELA 29 - COEFICIENTES DE VARIAÇÃO PARA MINERAIS	72
TABELA 30 - COMPARAÇÃO ENTRE AS RECOMENDAÇÕES PARA O RNBP E A CONCENTRAÇÃO MÉDIA NO LEITE MADURO OBSERVADA NESTE ESTUDO	79
TABELA 31- RESULTADO DA PESQUISA MICROBIOLÓGICA, NOS DIFERENTES TEMPOS DE MANIPULAÇÃO	83
TABELA 32 - CARACTERÍSTICAS DO HIDROLISADO PROTÉICO	87
TABELA 33 - PERFIL NUTRICIONAL DO SUPLEMENTO	92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - TESTE DE ACIDEZ DORNIC	58
FIGURA 2 - PASTEURIZAÇÃO DO LEITE	59
FIGURA 3 - PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS	59
FIGURA 4 - LEITE PASTEURIZADO ARMAZENADO	60
FIGURA 5 - <i>BOX-PLOT</i> DOS NUTRIENTES DO LEITE HUMANO	63
FIGURA 6 - <i>BOX-PLOT</i> DOS MINERAIS DO LEITE HUMANO	67
FIGURA 7 - TEOR DE LIPÍDIOS NOS DIVERSOS TIPOS DE LEITE	73
FIGURA 8 - TEOR DE LACTOSE NOS DIVERSOS TIPOS DE LEITE	74
FIGURA 9 - TEOR DE PROTEÍNAS NOS DIVERSOS TIPOS DE LEITE	75
FIGURA 10 - TOTAL DE CALORIAS NOS DIVERSOS TIPOS DE LEITE	76
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CORRELAÇÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS	77
FIGURA 12 - MÉTODO DO CREMATÓCRITO / DIFERENTES CAPILARES	78
FIGURA 13 - TEOR DE MINERAIS NOS DIVERSOS TIPOS DE LEITE	82
FIGURA 14 - ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	84
FIGURA 15 - DIFERENÇAS NA COMPOSIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS ENTRE LEITE HUMANO E HIDROLISADO ALITAL .	89
FIGURA 16 - ATIVIDADE DE ÁGUA DO SUPLEMENTO EM DIFERENTES TEMPOS DE PREPARO	95

RESUMO

O leite humano é sem dúvida o melhor alimento para o recém-nascido, pelo que vem sendo valorizado de forma crescente o aleitamento materno, principalmente do ponto de vista bioquímico, fisiológico, imunológico, psicológico e econômico. O recém-nascido de baixo peso (RNBP), prematuro ou pequeno para a idade gestacional, é vulnerável à subnutrição e, portanto, ao risco de infecções e do prolongamento de doenças crônicas, influenciando de modo adverso o crescimento e funcionamento do cérebro. O leite humano coletado e processado em Bancos de Leite é uma alternativa segura e menos dispendiosa no tratamento dietético destes lactentes. O objetivo deste estudo foi analisar a composição de macronutrientes e micronutrientes minerais do leite humano coletado e processado em Banco de Leite, admitindo-se a hipótese de flutuação na mesma, em vista das especificidades das doadoras e do processamento (podendo não manter um padrão que atenda às necessidades em pauta) e desenvolver um suplemento que incorporado ao leite humano ofereça os nutrientes que satisfaçam às exigências específicas do RNBP. Foram analisadas, em triplicata, 46 amostras de leite de diferentes doadoras, para as análises dos macronutrientes, sendo divididas em 3 grupos: 26 de leite maduro, 10 de colostro e 10 de leite prematuro; e 30 amostras para as análises de micronutrientes minerais, divididas igualmente em 10 para cada grupo. As amostras recebidas, pasteurizadas, classificadas como leite maduro, colostro e leite de mães de recém-nascidos pré-termo, encontravam-se no estado líquido e eram provenientes de dois Bancos de Leite. A composição média observada e o desvio-padrão para leite maduro, colostro e leite de mães de recém-nascidos pré-termo foi respectivamente: lipídios (g%) - 2,56 ($\pm 0,8$); 2,48 ($\pm 0,91$); 2,48 ($\pm 0,76$), lactose (g%) - 8,6 ($\pm 0,93$); 7,05 ($\pm 0,92$); 6,56 ($\pm 1,41$), proteínas (g%) - 1,07 ($\pm 0,22$); 1,71 ($\pm 0,29$); 1,72 ($\pm 0,4$), calorias (kcal%) - 61,67 ($\pm 8,92$); 57,36 ($\pm 8,37$); 55,44 ($\pm 8,00$), cálcio (mg%) - 17,88 ($\pm 5,56$); 22,75 ($\pm 10,24$); 22,03 ($\pm 9,39$), magnésio (mg%) - 2,15 ($\pm 0,39$); 2,64 ($\pm 0,67$); 2,16 ($\pm 0,26$), potássio (mg%) - 35,53 ($\pm 7,54$); 43,75 ($\pm 14,32$); 44,37 ($\pm 12,83$), sódio (mg%) - 16,27 ($\pm 5,92$); 43,36 ($\pm 11,34$); 37,98 ($\pm 11,34$), zinco (mg%) - 0,46 ($\pm 0,26$); 0,75 ($\pm 0,25$); 0,72 ($\pm 0,26$), fósforo (mg%) - 9,98 ($\pm 1,72$); 9,31 ($\pm 4,30$); 8,47 ($\pm 2,43$). O presente estudo revelou uma variação na composição das amostras de leite, no caso de doadora para doadora e no caso de leite maduro, colostro e leite pré-termo, bem como valores aquém das necessidades específicas do RNBP, fazendo-se justificável uma adequação, através da adição de suplemento protéico e de minerais. Desenvolveu-se um suplemento de simples preparo, a fim de viabilizar sua produção na própria rotina dos Bancos de Leite, composto de hidrolisado protéico e minerais quelatos. O suplemento desenvolvido mostrou viabilidade operacional e financeira, não interferindo na qualidade microbiológica e imunológica do leite humano.

PALAVRAS CHAVES: leite humano, Banco de Leite, recém-nascido de baixo peso.

ABSTRACT

NUTRICIONAL ANALYSIS OF THE HUMAN MILK PROCESSED IN BANK OF MILK AND DEVELOPMENT OF A SUPPLEMENT THAT ASSISTS TO THE SPECIFIC NEEDS OF LOW BIRTH WEIGHT INFANT.

The human milk is the best food for the newly born, and has been considered of great value, mainly because its biochemical, physiologic, immunological, psychological and economic features. The low birth weight infant (LBWI), premature or small for its gestational age, is vulnerable to the sub nutrition and, therefore, to the risk of infections and of the prolongation of chronic diseases, influencing in an adverse way the growth and the brain development. The collected human milk processed in banks of milk is a safe and less costly alternative in the dietary treatment of these infants. The objectives of this study were: analyze the macronutrients and mineral micronutrients composition of the collected human milk processed in bank of milk, realizing variation in this method, due to donors' specificities and the process (can not maintain a pattern that always attend to the needs in the study); and develop a supplement that once incorporated to the human milk, would offer nutrients that satisfy to the specific demands of LBWI. It was studied 46 samples of milk from different donors divided into 3 groups, for macronutrients analyses: 26 mature milk, 10 colostrum and 10 premature milk; and 30 samples for mineral micronutrients analyses divided into 10 samples each group. Samples were sent by two banks of milk being in liquid state, pasteurized and classified as mature milk, colostrum and milk from mothers of new born premature (premature milk). The observed average composition and standard deviation for mature milk, colostrum and premature milk were, respectively: fats (g%) - 2,56 ($\pm 0,8$); 2,48 ($\pm 0,91$); 2,48 ($\pm 0,76$), lactose (g%) - 8,6 ($\pm 0,93$); 7,05 ($\pm 0,92$); 6,56 ($\pm 1,41$), proteins (g%) - 1,07 ($\pm 0,22$); 1,71 ($\pm 0,29$); 1,72 ($\pm 0,4$), calories (kcal%) - 61,67 ($\pm 8,92$); 57,36 ($\pm 8,37$); 55,44 ($\pm 8,00$), calcium (mg%) - 17,88 ($\pm 5,56$); 22,75 ($\pm 10,24$); 22,03 ($\pm 9,39$), magnesium (mg%) - 2,15 (0,39); 2,64 ($\pm 0,67$); 2,16 ($\pm 0,26$), potassium (mg%) - 35,53 ($\pm 7,54$); 43,75 ($\pm 14,32$); 44,37 ($\pm 12,83$), sodium (mg%) - 16,27 ($\pm 5,92$); 43,36 ($\pm 11,34$); 37,98 ($\pm 11,34$), zinc (mg%) - 0,46 ($\pm 0,26$); 0,75 ($\pm 0,25$); 0,72 ($\pm 0,26$), phosphorus (mg%) - 9,98 ($\pm 1,72$); 9,31 ($\pm 4,30$); 8,47 ($\pm 2,43$). These results revealed a variation in the composition of milk from donor to donor, and from mature milk to colostrum and premature milk, as well as values beneath the specific needs of a LBWI. Therefore, it is necessary an adjustment through the addition of protein and mineral supplements. It was developed a supplement of simple prepare, thus making its production possible in a bank of mil routine. The developed supplement showed operational and financial viability, not interfering in the microbiological nor imunological features of the human milk.

KEY WORDS: human milk, Bank of Milk, low birth weight infant.

1 INTRODUÇÃO

O leite materno é o alimento mais adequado para o recém-nascido e serve de referência para estabelecer seus requerimentos. Lactentes alimentados artificialmente estão sujeitos a maior risco de várias doenças, como: diarreia, infecção respiratória, septicemia neonatal, síndrome de morte súbita e alergia (TOMA, 2000).

Com o desenvolvimento do Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno - PNIAM, ocorrido a partir de 1981, retomou-se a valorização do leite materno no Brasil. Diversos avanços foram então alcançados, como a promoção e a expansão de Bancos de Leite.

A Portaria nº 322 SVS/MS (BRASIL, 1988a) reafirma que o leite materno é, incontestavelmente, o alimento ideal para crianças nos seus primeiros meses de vida; considera, outrossim, que o Banco de Leite Humano constitui uma solução para lactentes que não dispõem de aleitamento ao seio.

A mesma Portaria define Banco de Leite Humano como um "centro especializado, obrigatoriamente vinculado a um hospital materno e/ou infantil, responsável pela promoção e incentivo ao aleitamento materno e pela execução de atividades de coleta, processamento e controle de qualidade de colostro, leite de transição e leite humano maduro, para posterior distribuição, sob prescrição de médicos ou nutricionistas".

Recém-nascidos de baixo peso (RNBP), pré-termo (RNPT), com menos de 37 semanas, ou pequenos para a idade gestacional, abaixo do percentil 10 para sua idade, constituem uma das clientela mais representativas para recepção de leite produzido em Banco de Leite, sendo que o objetivo primordial da sua nutrição é proporcionar-lhes uma taxa de ganho de peso e crescimento capaz de assegurar-lhes boa saúde e maturidade orgânica.

Em 1997, a Academia Americana de Pediatria reconheceu os benefícios do

leite humano no manejo dos recém-nascidos de baixo-peso. Os benefícios são principalmente relacionados com o aprimoramento do sistema imune, digestão e absorção de nutrientes e neurodesenvolvimento (LUCAS et al., 1996; SCHANLER, 2001).

Muitos estudos documentam, entretanto, que o leite humano pode não oferecer quantidades adequadas de certos nutrientes, particularmente proteínas e minerais, para preencher as necessidades nutricionais desses lactentes (ATKINSON et al., 1981; SCHANLER, 1995; FRIEL et al., 1999).

Muitas pesquisas têm sido realizadas para determinar as necessidades nutricionais de recém-nascidos de baixo peso, persistindo, porém, muitas dúvidas ainda. Suas exigências dietéticas tomam por base, principalmente, o conhecimento dos nutrientes contidos no próprio leite humano (DINIZ, 1991). Entretanto, a variação da composição nutricional do leite materno, quanto ao teor de macronutrientes e micronutrientes em diferentes circunstâncias, pode gerar problemas clínicos, no caso específico dessa clientela.

Para KUSCHEL e HARDING (2000), o papel do leite humano para o RNPT é ainda pouco definido. Considerando insuficiente a quantidade de alguns nutrientes necessários ao bebê, seus estudos associam o incremento do ganho de peso de lactentes a uma suplementação do leite humano com fortificante contendo multicomponentes.

A Academia Americana de Pediatria (AAP-1985) recomenda um suprimento de macronutrientes para crianças de baixo peso, independentemente de sua idade gestacional, com maior concentração de proteínas e similar concentração de gordura e carboidratos, em relação à dieta de crianças nascidas a termo.

Alguns neonatologistas optam freqüentemente pelas fórmulas lácteas (leite infantil modificado – Portaria 977 - BRASIL, 1998b), que garantem uma composição química padrão e asseguram um ganho de peso mais satisfatório. Alegam que o leite humano possui composição variável e não satisfaz a crianças de baixo peso.

Em termos práticos, porém, o uso de fórmulas modificadas e o uso de suplementos implicam alto custo para a maioria dos hospitais brasileiros ou para os próprios pais da criança. Muitos recém-nascidos são mantidos internados em unidades de neonatologia por várias semanas, ou até meses. Este fator econômico deve ser considerado. "Registros da literatura revelam que o Brasil atinge perdas anuais superiores a duas centenas de milhões de litros de leite humano, passíveis de serem produzidos, em decorrência do desmame precoce. Além de representar uma perda significativa para os núcleos familiares, este fato gera importante acréscimo ao orçamento dos organismos governamentais, particularmente no que se refere ao setor de Saúde" (ALMEIDA, 1999).

O leite humano estocado em Banco de Leite é, sem dúvida, a alternativa mais segura e menos dispendiosa no tratamento dietético do RNBP, de lactentes patogênicos e de crianças desnutridas que recebem terapia nutricional.

O Centro de Referência Nacional para Bancos de Leite (Ministério da Saúde) incentiva a implantação de programas de certificação de qualidade, efetuados a partir de estratégias de maior rigor, tanto do ângulo técnico como econômico.

A proposta deste estudo vem ao encontro da real necessidade de se avaliar a composição nutricional e os aspectos microbiológicos do leite oferecido no Banco de Leite, bem como de se experimentar a produção de um suplemento para o leite materno, reconhecidamente seguro para tais casos, do ponto de vista nutricional e microbiológico. Uma metodologia que possa minimizar as flutuações da composição do leite, aliada ao desenvolvimento de um suplemento que ofereça maiores concentrações dos nutrientes requeridos e que se enquadre no processamento rotineiro em Banco de Leite, pode assegurar aos terapeutas um produto ideal.

1.1 JUSTIFICATIVA

Partindo do pressuposto de que existe variação na composição do leite humano coletado em Banco de Leite, e de que as necessidades nutricionais do RNBP

requerem incremento, torna-se justificável um estudo experimental para a produção de um suplemento específico para esta clientela.

Diante do avanço da medicina, a sobrevivência de RNBP, pré-termos ou não, passa a constituir novo quadro de pacientes nos setores de neonatologia.

A terapia nutricional representa um papel fundamental para a sobrevivência e desenvolvimento destes bebês. No contexto da Saúde Pública, o Banco de Leite torna-se valioso instrumento para a melhoria dos recursos necessários a essa terapia.

O momento atual requer a busca de um aprimoramento das técnicas de produção do leite em Banco de Leite. Abre-se, portanto, um espaço favorável à viabilização do presente estudo, mediante um diagnóstico da composição nutricional do leite coletado, além de experimentos que visem à sua padronização e melhoria.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos Gerais

- Analisar a composição de macronutrientes e micronutrientes minerais do leite humano, coletado e processado em Banco de Leite;
- desenvolver um suplemento que, incorporado ao leite humano, ofereça os nutrientes que satisfaçam às exigências específicas do RNBP.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar as variações na composição de macronutrientes e micronutrientes minerais de leite humano coletado em Banco de Leite e sua adequação para RNBP;
- comparar as análises do total de gordura, efetuadas pelo crematócrito em Banco de Leite, e pelo método de Butirômetro de GERBER, a fim de avaliar a eficiência do primeiro;
- avaliar o padrão microbiológico do leite humano processado em Banco de Leite;

- avaliar as possíveis interferências da qualidade microbiológica e imunológica do leite humano, quando suplementado;
- avaliar a viabilidade prática e econômica do produto desenvolvido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEITE HUMANO

Segundo ALMEIDA (1999), não constitui motivo de dúvida a excelência do leite materno como alimento para lactentes, e seu uso vem sendo cada vez mais imposto, à medida que se tornam mais conhecidas as suas propriedades, assim como as necessidades nutricionais e as particularidades fisiológicas do metabolismo da criança.

O aleitamento materno vem sendo valorizado de maneira crescente, podendo seus benefícios ser analisados do ponto de vista bioquímico, fisiológico, imunológico, psicológico e econômico.

A Academia Americana de Pediatria (AAP, 1997) recomenda o aleitamento ao seio durante todo o primeiro ano de vida do recém-nascido a termo e reconhece os benefícios do leite humano no manejo dos lactentes prematuros. Os efeitos benéficos relacionam-se geralmente com a defesa do indivíduo, digestão e absorção de nutrientes, desenvolvimento neurológico, função gastrintestinal e efeitos psicológicos sobre a mãe. Pesquisas nos Estados Unidos, Canadá, Europa e outros países desenvolvidos, entre populações predominantemente de classe média, atestam que a alimentação com o leite humano diminui a severidade e/ou incidência de diarreia, infecções respiratórias, otite média, meningite bacteriana, botulismo, infecção do trato urinário e enterocolite necrotizante (SCHANLER, 1998). Diversos estudos apontam o possível efeito protetor do leite humano contra síndrome de morte súbita, *diabetes melitus insulino* dependente, doença de Crohn, colite ulcerativa, linfoma, distúrbios alérgicos e algumas doenças digestivas crônicas (LONNERDAL, 2000).

Estudos clínicos em berçários de todo o mundo revelam diminuição na incidência de várias infecções em lactentes de baixo peso alimentados com leite humano, se comparados aos usuários da alimentação com fórmulas. Outro estudo

(LUCAS, 1990), avaliando lactentes prematuros hospitalizados, indicou incidência de enterocolite necrotizante significativamente menor em lactentes alimentados com leite humano, seja exclusiva ou parcialmente, do que nos lactentes alimentados com fórmulas.

Do ponto de vista bioquímico, são importantes os dados comparativos entre o leite humano e o leite de vaca, que comumente substitui o primeiro.

Ao analisar-se a composição do leite humano, distingue-se o colostro, o leite de transição, o leite maduro e o da mãe de um recém-nascido pré-termo. Cada um destes tipos possui composição diferente, o mesmo ocorrendo em relação às distintas etapas da amamentação, às diferentes horas do dia e até às fases da mesma mamada, do começo ao término (HAMOSH, 1985; BRASIL, 1988c; SCHANLER, 1995).

O colostro, produzido nos 5 primeiros dias pós-parto, é um fluido amarelo e espesso que fornece em média 54 kcal%, apresenta em média 2,9g% de lipídios, 5,7g% de lactose e 2,3 g% de proteínas; quase três vezes mais proteínas que o leite maduro. As vitaminas lipossolúveis encontram-se em alta concentração no colostro, destacando-se o beta-caroteno, que lhe confere a cor amarelada. Destaca-se também a concentração de imunoglobulina A (IgA), lactoferrina, linfócitos e macrófagos, que proporcionam ação protetora ao recém-nascido. O leite de transição é produzido entre o quinto e o décimo quinto dia pós-parto. Sua composição altera-se ao longo dos dias, variando das características do colostro às do leite maduro. O leite maduro proporciona 70Kcal/100mL; seu volume médio é de 700 a 900mL/dia, durante os seis primeiros meses pós-parto, e aproximadamente 600 mL/dia no segundo semestre. Seus principais constituintes são proteínas (1%), carboidratos (7%), lipídios (4%), minerais e vitaminas (LAWRENCE, 1989; BRASIL, 1998c).

ISSLER, em 1991, e ALMEIDA, em 1999, afirmam que a composição química do leite humano corresponde perfeitamente às necessidades nutricionais do recém-nascido e atende às peculiaridades fisiológicas do seu metabolismo, tanto sob o aspecto qualitativo, como quantitativo.

O leite humano é uma mistura homogênea que se estrutura na forma de um sistema, composto por três subsistemas ou fases, assim definidos: fração emulsão - glóbulos de gorduras; fração suspensão - micelas de caseína; fração solução - constituintes hidrossolúveis. No início da mamada o leite é predominantemente composto por elementos solúveis, que vão sendo progressivamente substituídos pelos integrantes da fração suspensão; estes por sua vez, acabam por ceder lugar aos componentes lipossolúveis da fração emulsão. Deste modo, ao longo da mamada completa, a criança não recebe um leite de composição fixa. Recebe um produto dinâmico, mutável, cujas características distintas ajustam-se a cada momento da alimentação ao seio (ALMEIDA, 1999).

Dois períodos de lactação podem ser descritos. O primeiro estende-se do sexto mês de gravidez aos dois a quatro dias após o parto (leite colostro), quando é alta a taxa de prolactina, progesterona, estrógenos e lactogênio placentário humano (HPL), sendo a secreção láctea escassa e fundamentalmente determinada por uma filtração paracelular, rica em proteínas, sódio e células. O segundo período, iniciado em torno do terceiro ao quarto dia após o parto, estende-se até o término da lactação (leite maduro); é regulado por um aumento da prolactina e ocitocina e pela diminuição de estrógenos, progesterona e HPL. É produzido no epitélio mamário e a síntese ocorre por transporte transcelular (NEVILLE et al., 1988).

O volume de leite produzido varia de uma nutriz para outra. A quantidade de tecido glandular mamário, o estado de nutrição, a ingestão calórica, a estatura materna e o tabagismo têm sido relacionados com o volume. A variação na composição de macronutrientes (de uma mãe para outra) é mínima quanto aos carboidratos, de 10% quanto às proteínas e de 30% quanto aos lipídios. (MICHAELSEN et al., 1994).

2.1.1 Proteínas

O leite de vaca possui uma concentração protéica três vezes maior que o leite humano. Seus principais elementos são a caseína e a lactoglobulina (Tabela 1). Devido aos coágulos grandes e duros, a caseína é de difícil digestão, enquanto a lactoglobulina é o componente mais responsabilizado pelas alergias ao leite de vaca. No leite humano, a maior fração é representada pelas proteínas do soro (70%), perfeitamente adaptadas ao metabolismo da criança, além de provocarem efeitos benéficos importantes, como fatores anti-infecciosos, por exemplo. A principal é a alfa-lactoalbumina. Além de ser uma proteína de alto valor biológico, atua como catalisador na síntese da lactose (ISLLER, 1991). Outra proteína do soro, a lactoferrina, além de sua ação bacteriostática, contribui para a absorção de ferro intestinal (RAIHA, 1985; LAWRENCE, 1989; SCHANLER, 1995). A lisozima tem propriedades bacteriolíticas e anti-inflamatórias (GOLDMAN et al., 1986). As imunoglobulinas, particularmente a imunoglobulina A (IgA), que é a principal na composição do leite, protegem as glândulas mamárias da mãe, assim como as mucosas do recém-nato (NEWMAN, 1995; LONNERDAL, 2000).

A taxa de lactoalbumina, em relação à da caseína, é mais elevada na fase do colostro e durante os primeiros dias de lactação: apresenta proporção de 90:10, contra 60:40 no leite maduro (KUNZ e LONNERDAL, 1992; EUCLYDES, 1997).

O leite humano apresenta aminograma bastante diferente do leite de vaca. A relação metionina/cistina (0,69) é quatro vezes menor no primeiro. Trata-se de uma observação importante, no caso do RNPT, o qual não consegue desdobrar a metionina, utilizando somente a cistina como aminoácido sulfurado. As concentrações de tirosina e fenilalanina são maiores no leite de vaca, podendo ocorrer elevado nível sérico destes aminoácidos, com possíveis seqüelas tardias no sistema nervoso do RNPT. O aminoácido taurina é abundante no leite humano e deficiente no leite de vaca. Tem sido considerado por muitos autores como essencial, tendo-se em vista a incapacidade de ser sintetizado pelo lactente, em face da ausência das enzimas conversoras

cistionase e descarboxilase do ácido cistéino sulfínico (WORTHINGTON, 1993; ISSLER, 1991; BENKOV, 1987; LAWRENCE, 1989).

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO PROTÉICA DOS LEITES HUMANO E DE VACA

	LEITE HUMANO (g/100mL)	LEITE DE VACA (g/100mL)
Proteínas totais	0,89	3,32
Caseínas	0,25	2,60
Alfa-caseína	0	1,95
Beta-caseína	0,25	0,35
Kapta-caseína	traços	1,0
Proteínas do Soro	0,70	0,67
Alfa-lactalbumina	0,26	0,12
Beta-lactoglobulina	0	0,3
Lactoferrina	0,17	traços
Lisozima	0,05	traços
Albumina	0,05	0,03
Imunoglobulinas	0,105	0,066
Outras	0,07	0,15
Total de N não-protéico	0,25	0,28

FONTE: HAMBREUS (1985); LEE (1992)

Principalmente quando se trata de colostro, o leite materno é muito rico em nucleotídeos, importantes por participarem de forma indireta na síntese protéica (EUCLYDES, 1997).

Com relação à matéria nitrogenada, admitiu-se durante muitos anos um teor de proteínas de 1,1 a 1,2%, tendo-se por base o fator 6,25 ou 6,30 (proteína crua). Comprova-se, no entanto, que o teor de proteína do leite é de 0,9%, uma vez que 20-25% do nitrogênio total não são protéicos. Os principais constituintes da fração não protéica são os nucleotídeos, a creatinina, o ácido úrico, a uréia, os pequenos peptídios e os aminoácidos livres (BRASIL, 1998c). A presença de nucleotídeos, derivados do ácido nucléico, tem papel importante na síntese de proteínas em recém-nascidos alimentados com dietas de baixo teor protéico (LAWRENCE, 1989).

2.1.2 Gordura

O teor de gordura é menor no colostro, elevando-se ao longo do período de lactação (LAWRENCE, 1989). A gordura apresenta-se emulsionada, constituída principalmente por glicerídios dos ácidos palmítico, esteárico e oléico, em que a trioleína representa 36% do total, ficando os ácidos voláteis responsáveis por 1,2%. Seu conteúdo total médio é de 50%. É o componente mais variável no leite humano. Conforme o estágio de lactação, estes níveis variam de 2,04g/dL para 4,87g/dL, graduação que aumenta de acordo com a maturação do leite. Sua concentração é maior no final da mamada, o que torna essencial o esvaziamento da mama, a fim de que o lactente receba o leite mais rico em gordura (HAMOSH, 1985; LAWRENCE, 1989; BRASIL, 1998c).

Em quase sua totalidade, a gordura do leite humano está envolta por uma membrana fosfolipoprotéica originada na célula alveolar materna. O fato de estar a gordura sob a forma de glóbulos mantém a estabilização da emulsão; minimiza as interações indesejáveis que poderiam resultar de reações entre ácidos graxos livres e cálcio, além de maximizar os processos de digestão e absorção de nutrientes pelo lactente (ALMEIDA, 1999).

Os lipídios do leite humano variam amplamente em quantidade e qualidade. Durante a lactação, a concentração de triacilgliceróis aumenta e a de colesterol e fosfolipídios diminui, na medida em que o tamanho dos glóbulos aumenta. A concentração de lipídios produzida depende de características da glândula mamária e da estimulação da lipase lipoprotéica pela prolactina. A concentração de lipídios depende da dieta da mãe, tanto durante a gestação, como durante a amamentação (JENSEN, 1996; ALMEIDA, 1999).

Quase 90% dos lipídios do leite apresenta-se na forma de triacilgliceróis. São encontradas, porém, pequenas quantidades de fosfolipídios, colesterol, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicolipídios e ácidos graxos livres. No leite de vaca predominam

os ácidos graxos saturados, enquanto no leite humano prevalecem os insaturados. O leite humano é rico em ácidos graxos polinsaturados, principalmente o ácido linoléico, que representa 7% dos ácidos graxos totais ou 5,6% do valor calórico total (EUCLYDES, 1997). O leite humano contém cerca de 0,5% de ácido aracdônico e 0,3% de ácido docosahexanóico, com níveis mais elevados no colostro e no leite de mães de prematuros (INNIS, 1992).

O leite humano é, portanto, rico em ácidos graxos insaturados e essenciais, envolvidos com a síntese do tecido nervoso (mielinização) e das prostaglandinas. É elevado o teor de ácido linoléico livre e outros ácidos graxos, o que constitui importante fonte energética para o lactente. O ácido linoléico ocorre dentro das proporções fisiológicas, guardando ótima relação com a vitamina E, o que impede a formação de peróxidos. O ácido palmítico ocorre na forma de glicerídeo, ligado principalmente na posição 2, é absorvido como monoacilglicerol, evitando a produção de palmitato de cálcio no intestino e conseqüente perda de gordura e cálcio (GOEDHART, 1994; BRASIL, 1998c).

O leite humano contém carnitina (50 a 100 mmol/mL), cujo papel na oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa é importante, facilitando seu transporte para o interior da mitocôndria e, conseqüentemente, sua utilização como fonte energética do lactente (FOMON, 1993; WORTHINGTON, 1993).

Pela sua ação bactericida, os ácidos graxos de cadeia curta assumem particular importância. Devido à sua baixa capacidade de ionização (pKa), muitas vezes são confundidos, pelos microrganismos, como fonte de carbono e energia, e transportados para o interior de suas células. Ao entrar no citoplasma microbiano, tais ácidos se ionizam, mudando o pH do meio e desestruturando as rotas enzimáticas necessárias à manutenção da vida celular (BRASIL, 1998c).

2.1.3 Carboidratos

Os carboidratos têm sido identificados de forma livre, e também combinados com aminoácidos ou proteínas. O teor varia geralmente entre 7,0 a 7,5%, 15% dos quais são oligossacarídeos, sendo a lactose (dissacarídeo) o carboidrato dominante (BRASIL, 1998c; LAWRENCE, 1989; EUCLYDES, 1997).

A lactose é, portanto, o principal constituinte entre os carboidratos presentes nos alimentos. É importante por favorecer a absorção de cálcio, metabolizada em galactose, que intermedia a formação de galactolipídios, substrato importante para o sistema nervoso central; promove crescimento de lactobacilos no intestino, os quais dificultam a proliferação bacteriana através da queda de pH (LAWRENCE, 1989; KELLY et al., 1994; GOEDHART et al., 1994; BRASIL, 1998c; LONNERDAL, 2000).

Os carboidratos complexos, como a N-acetilglicosamina e os oligossacarídeos, encontram-se livres ou ligados a proteínas. São estes carboidratos e as glicoproteínas que estimulam o crescimento do lactobacilo bífido, bactéria predominante no intestino do lactente amamentado, protegendo-o contra a colonização de microrganismos patogênicos (LAWRENCE, 1989). Alguns oligossacarídeos aderem aos receptores localizados nas células das membranas da mucosa da faringe, impedindo a aderência de certas bactérias patogênicas que ali se multiplicam (GOLDMAN et al., 1986).

2.1.4 Vitaminas e Minerais

Desde que a mãe esteja em bom estado nutricional, o leite humano conterà 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).

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 (ISSLER, 1991; FOMON, 1993; BRASIL, 1998c; 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).

2.1.5 Aspecto imunológico e protetor

Além do ponto de vista bioquímico, o leite humano protege a criança de agravos infecciosos ambientais.

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 antiinfecciosa, que podem ser classificados em celulares e humorais (FACCHINI, 1996).

Segundo INSTITUTE OF MEDICINE (1991), NEWMAN (1995), ALMEIDA (1999) e LONNERDAL (2000), os principais constituintes do leite humano que atuam como agentes de proteção ao organismo do lactente são: imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM, IgD, IgE), linfócitos, macrófagos (importantes na

produção de complemento C3 e C4), lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, ácidos carboxílicos livres, proteinases e oligossacarídeos, os quais constituem o fator de crescimento da flora bífida e são conhecidos como "fator bífido".

A predominância de *Lactobacillus bifidus* na flora mantém a população de gram-negativos em níveis baixos. A metabolização dos açúcares lácteos por estes bacilos produz grandes quantidades de ácido acético, ácido láctico, ácido succínico e fórmico, mantendo baixo o pH das fezes. A presença de *Lactobacillus* e a ação da lactoferrina e lisozima faz com que a população de patógenos permaneça sob controle (FACCHINI, 1996).

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 *Satphylococcus*. 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 (OSKI, 1982; LOVEGROVE, 1994).

A IgA secretória transmite ao leite propriedades antigênicas contra *S. pneumoniae*; *H. influenzae*; enterobactérias, principalmente *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Clostridium*, vírus gripal, polivírus, rotavírus, e mesmo parasitas,

como *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolitica*, dentre outros. Estudos comprovam que uma ampla variedade de patógenos é inibida por componentes do leite humano, como o *Vibrio cholerae*, *Camphylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*. A Tabela 2 apresenta um resumo do papel imunológico do leite humano (NEWMAN, 1995; EUCLYDES, 1997; LONNERDAL, 2000).

TABELA 2 - BENEFÍCIOS IMUNES DO LEITE HUMANO

FATORES PROTETORES PRESENTES NO LEITE HUMANO	
Componentes	Ação dos Leucócitos
Linfócitos B	Produzem anticorpos para alvos específicos Síntese de imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG)
Macrófagos e polimorfos	Atacam outros componentes do Sistema Imune Mortes de bactérias e fagocitose
Neutrófilos	Podem agir como fagócitos ingerindo uma bactéria do Sistema Imune
Linfócitos T	Atacam células infectadas diretamente ou enviam mensagem para mobilizar outras células. Proliferam na presença de organismos que causam sérias doenças em recém-natos. Produzem compostos que estimulam a resposta imune da criança
IgA secretória	Liga-se a microrganismos do trato gastrointestinal e previne a passagem dos mesmos da garganta aos tecidos (rotavírus e enterotoxinas)
Proteína ligante a B12	Reduz a quantidade disponível de vitamina B12 a bactérias que dela necessitam para o crescimento
Fator Bífido	Promove o crescimento do <i>Lactobacillus bifidus</i> que inibe o crescimento de bactérias patogênicas
Ácidos graxos	Rompem membranas de certos vírus, destruindo-os (herpes simples, estomatite, citomegalovírus)
Fibronectina	Aumenta a atividade antimicrobiana dos macrófagos, auxilia no reparo de tecidos danificados por inflamação
Interferon Gama	Aumenta a atividade antimicrobiana das células imunes
Hormônio e fator de crescimento	Estimulam o desenvolvimento mais rápido do trato gastrointestinal dos bebês, tornando-os menos vulneráveis a doenças
Lactoferrina	Liga-se ao ferro e reduz o ferro disponível a bactérias que dele necessitam para o seu desenvolvimento
Lisozima	Rompe a parede celular das bactérias (bactericida)
Mucinas	Aderem-se a bactérias e vírus, evitando o ataque à mucosa
Oligossacarídeos	Ligam-se a microrganismos, evitando o ataque à mucosa
Anticorpos IgM e IgG	Específicos contra alérgenos; neutralizam toxinas e vírus
Antioxidantes	Neutralizam atividade inflamatória no sistema imunológico
Fator antiestafilocócico	Inibe a infecção estafilocócica
RNase antivirótica	Inibe a atividade virótica
Catalase, glutationaperoxidase	Destroem peróxidos
Inibidores de proteases	Inibem proteases e diminuem inflamação

FONTE: Baseado em NEWMAN (1995), EUCLYDES (1997) e LONNERDAL (2000)

A ocorrência de alergias à proteína do leite é com certeza um dos prejuízos do uso do leite de vaca por lactentes jovens (até três meses). Manifestam-se por transtornos digestivos, como diarreia, vômito, dores abdominais; transtornos dermatológicos (como eczemas) e transtornos respiratórios, como bronquite e asma (CHANDRA et al., 1999).

Diversos estudos indicam que alguns fatores do leite humano podem induzir o sistema imune do bebê a desenvolver-se mais rapidamente do que se ele ingerisse leite industrializado. Por exemplo, o organismo de bebês amamentados ao seio produz altos níveis de anticorpos em resposta a uma vacina. Também certos hormônios, como o cortisol e hormônios relacionados ao crescimento, protegem a mucosa do bebê, tornando-a impermeável à invasão de patógenos. Foi demonstrado que o desenvolvimento do intestino ocorre mais tarde em animais não amamentados, enquanto nos amamentados que recebem colostro rico em fatores do crescimento o desenvolvimento acontece mais rápido (NEWMAN, 1995).

Estudos de FACCHINI (1996) demonstram que crianças normais de baixo nível social, amamentadas, apresentaram menor ocorrência de doenças infecciosas, estatisticamente significativa para o caso de gastroenterocolite.

Estudos clínicos sugerem redução da taxa de várias infecções em recém-nascidos de baixo peso alimentados com leite humano (fresco ou pasteurizado), em comparação àqueles alimentados com fórmulas infantis (NARAYANAN, 1989; SCHANLER, 1995; SCHANLER, 2001). A redução na incidência de enterocolite necrotizante também foi significativamente menor em recém-nascidos alimentados, exclusiva ou parcialmente, com leite humano (LUCAS et al., 1996; SCHANLER, 2001).

WILLS et al. (1982) demonstraram que o leite humano aquecido pelo método tradicional de pasteurização (a 65°C por 30 minutos) tem diminuída a sua propriedade anti-infecciosa, especialmente quando é suplementado ou oferecido

paralelamente a outras fórmulas. A pasteurização em temperatura mais baixa e por menos tempo (a 56°C por 15 minutos) demonstrou *in vitro* ser mais efetiva para a preservação de fatores antiinfecciosos, como a IgA, lactoferrina e lisozima. Afirmam estes autores que tais elementos de proteção agem igualmente contra organismos que podem contaminar o leite humano durante sua expressão, transporte e administração final.

Segundo RAIHA (1989), as perdas causadas pelo resfriamento são menores do que pelo aquecimento. Variam de acordo com o tempo e a temperatura de aquecimento, com a temperatura de resfriamento e com o volume do leite processado.

BJORKSTEN et al. (1980) mostraram os efeitos do processamento sobre os componentes protetores do leite (Tabela 3).

Vantagens de cunho psicológico e econômico são indiscutíveis, tanto para a mãe que amamenta como para a criança aleitada. O estabelecimento do vínculo afetivo mãe-filho, sendo de custo zero e garantindo proveito à saúde materna, é mais uma das vantagens do uso do leite humano, em detrimento de outro (BRASIL, 1998c; AAP, 1997).

TABELA 3 - EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO, DO CONGELAMENTO E DO DESCONGELAMENTO SOBRE OS COMPONENTES PROTETORES DO LEITE HUMANO (% DE REDUÇÃO)

CONSTITUINTE	TRATAMENTO TÉRMICO		CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO
	62,5°C – 30 min	70 - 73°C – 15/30min	- 20°C por 3 meses
IgA	0 - 33	33 - 100	0 - 3
IgG	34	97	0 - significativa
IgM	100	-	significante
Lactoferrina	0 - 63	94 - 100	0
Capacidade de ligação ao Fe	44 - 47	100	-
Lisozima	0 - 23	35	0 - 10

FONTE: BJORKSTEN et al. (1980)

2.2 TERAPIA NUTRICIONAL PARA O RECÉM-NASCIDO DE BAIXO PESO

No caso do RNBP (pré-termo ou a termo), a nutrição tem como objetivo primordial um adequado crescimento e desenvolvimento, além da diminuição da morbiletalidade.

Segundo LEARY (1989), um recém-nascido que pese menos de 2.500g ao nascer está classificado como recém-nascido de baixo peso (RNBP), ao passo que um recém-nascido pesando menos de 1.500g é classificado como tendo um peso muito baixo. De acordo com AKRÉ (1989), um recém-nascido pode apresentar baixo peso devido a um período de gestação mais curto (menor que 37 semanas), o que o caracteriza como prematuro; ou devido a uma velocidade de crescimento retardada, o que o torna pequeno para a idade gestacional (pesando menos que o percentil 10 do peso padrão para a idade gestacional). Os recém-nascidos de baixo peso podem ser ainda, ao nascer, separados em dois outros grupos: os de peso muito baixo (< 1500g-1000g) e os de peso extremamente baixo (< 1000g).

Os RNBP nascem com reservas metabólicas menores do que os nascidos a termo (RN). As reservas de glicogênio e gorduras são limitadas, o que os tornam, e logo, dependentes de ingestão de energia exógena para suprir as suas necessidades metabólicas e para atender às funções de suporte básico de vida. O bebê prematuro pequeno é especialmente vulnerável à subnutrição, o que pode aumentar o risco de infecções, prolongar doenças crônicas e influir de modo adverso no crescimento e funcionamento do cérebro (ANDERSON, 1999).

Ao nascer, a criança perde todo o suporte nutritivo e metabólico proporcionado pela placenta e passa a depender de estruturas que no prematuro ainda não estão suficientemente desenvolvidas. As limitações impostas por esta imaturidade devem ser respeitadas. Por exemplo: a capacidade gástrica do RN varia de 2mL por kg/peso no primeiro dia, atingindo valores de 24mL/kg de peso no 10º dia de vida (ANDERSON, 1999).

De maneira geral, pode-se afirmar que o RNBP apresenta boa capacidade de digestão das proteínas, bem como eficiente mecanismo de absorção de aminoácidos, cujo transporte ativo pela mucosa intestinal já é observado a partir da 12ª semana de gestação.

Segundo a AAP (1985), os requerimentos estimados para proteína são de 3,5 para 4,0g/kg/d. Segundo o ESPGAN (1987), sintomas como baixo ganho de peso, baixa uréia plasmática, baixa albumina plasmática e baixo conteúdo de nitrogênio justificam a suplementação do leite humano com proteína ou fórmula. A medida é vantajosa, principalmente se a criança é de muito baixo peso e se recebe o leite, total ou parcialmente, da própria mãe.

As enzimas hepáticas devem ser avaliadas quando se vai decidir sobre a quantidade e a qualidade de proteínas ou aminoácidos a serem oferecidos ao RNBP. A enzima cistionase, responsável pela conversão da cistionina (resultante do metabolismo da metionina) em cistina, não foi encontrada em fígado de RNBP. Em RN, a sua atividade é baixa. A cistina é considerada, portanto, um aminoácido essencial, até que ocorra a maturação desta via metabólica. Um RN submetido a dieta com leite de vaca pode apresentar cistionúria e elevados níveis plasmáticos de metionina. Pela sua maior concentração de cistina e menor de metionina, o leite humano (LH) atende melhor às características metabólicas do RNBP. Sendo também imatura a via de conversão da cistina em taurina, a ministração deste aminoácido torna-se essencial para o prematuro. O LH é rico em taurina (ESPGAN, 1987).

Por volta de 28 semanas, os níveis de atividade das dissacaridases, exceto da lactase, são iguais aos apresentados pelo RN. Neste período, o recém-nascido pré-termo pode apresentar teste de tolerância à lactose, mesmo na ausência de diarreia. A atividade da lactase aumenta rapidamente nos primeiros dias de vida. O RNBP pode inicialmente ter dificuldade na digestão da lactose, o que às vezes causa proliferação bacteriana e distensão abdominal por efeito osmótico. Suplementos de lactose não deveriam ser somados ao leite humano para aumentar o conteúdo de energia

(ESPGAN, 1987). Entretanto, glicosidases para polímeros de glicose são ativas em prematuros pequenos, tornando-se uma opção para fórmulas, que então utilizam 40-50% de lactose e 60% de polímeros de glicose (AAP, 1985).

No que se refere ao metabolismo das gorduras, o RNPT não apresenta bom desempenho. O motivo pode ser a inadequada síntese de sais biliares, ou possivelmente uma deficiência de lipase. Se a composição dos lipídios da dieta forem de cadeia média ou ácidos graxos insaturados, haverá maior aproveitamento. A posição do ácido palmítico na molécula do triacilglicerol também influencia a sua absorção. Quando situado na posição 2, como acontece no leite humano, é mais bem absorvido do que nas posições 1 ou 3, como ocorre no leite de vaca. As fórmulas especiais desenvolvidas para crianças prematuras contêm uma mistura de cadeia média de triacilgliceróis e predominantemente de cadeias longas de triacilgliceróis insaturados (AAP, 1985).

A absorção de gordura tem-se mostrado mais eficaz quando as lipases do leite humano se mantêm íntegras. Assim sendo, prematuros com peso inferior a 1.300g, alimentados com leite humano pasteurizado, absorvem 30 a 40% menos de gordura do que os alimentados com leite cru (ESPGAN, 1987; SCHANLER, 1995). No caso do RNBP que recebe leite expressado, deve este ser homogeneizado, pois a gordura se separa e pode aderir aos recipientes de coleta, tubos e seringas (SCHANLER, 1995).

A função do sistema lipídico foi testada em RNBP alimentados com uma mistura de 40% de leite fresco e 60% de fórmula para pré-termo. O uso desta combinação aumentou para 95% a absorção de gordura, cuja taxa era de 89% quando RNBP eram alimentados exclusivamente com fórmulas (SCHANLER, 1995). É de consenso que o leite humano promove mais rápido esvaziamento gástrico, comparado a fórmulas infantis (SCHANLER, 2001).

Algumas pesquisas têm focalizado a presença dos ácidos graxos de cadeia muito longa, ácidos aracdônico (20:4n-6) e docosahexaenóico (22:6n-3), encontrados

apenas do leite humano. Estas substâncias estão sendo associadas ao melhor desenvolvimento cognitivo, crescimento e acuidade visual, em RNBP alimentados com leite humano (SCHANLER, 1995; SCHANLER, 2001). Apesar das baixas taxas de crescimento, os prematuros alimentados exclusivamente com leite humano apresentaram vantagens no desenvolvimento psicomotor, aos 18 meses de idade, comparados a lactentes recebendo fórmulas para pré-termos (LUCAS et al., 1996).

Também o rim possui capacidade funcional deficiente no RNPT. Dados obtidos em pesquisa sugerem uma redução da reabsorção de sódio, glicose e aminoácidos, paralelamente a um aumento da excreção de bicarbonato (JORGE, 1995; ANDERSON, 1999).

RNBP, particularmente os nascidos com peso menor do que 1500g, não possuem um mecanismo de conservação do sódio renal bem desenvolvido, cuja excreção é alta nos primeiros 10 a 14 dias de vida. Assim, a baixa concentração de sódio do leite humano maduro ou de algumas fórmulas para recém-nascidos a termo conduz à hiponatremia. Fórmulas especiais para crianças prematuras pequenas devem prover de 2,5-3,5mEq/kg/d de sódio. Crianças nascidas com peso menor que 1500g podem requerer de 4 a 8mEq/kg/d. A exigência de potássio para RNBP parece ser similar à de crianças a termo, de 2-3mEq/kg/d (AAP,1985). No caso do uso do leite humano, é exigido um monitoramento regular da concentração de sódio plasmático. Quando necessário, seria importante um suplemento de sódio (ESPGAN, 1987).

RNBP alimentados com leite humano correm o risco de desenvolver a síndrome de depleção de fosfato e doenças dos ossos. A necessidade de cálcio para crianças prematuras pesando entre 800 e 1200g é de 210mg/kg/d. A fórmula comumente usada para crianças a termo contém de 44 a 52mg/dL de cálcio, enquanto que, para o RNBP que pese mais de 1200g ao nascer, é indicada uma ingestão de 160-250mg/kg/dia de cálcio e 110-125mg/kg/dia de fósforo. Existe uma boa evidência sobre as fórmulas especiais atualmente disponíveis para crianças prematuras. Têm sido suplementadas com cálcio e fósforo, podendo concorrer para o crescimento do osso

pós-natal e para a mineralização na taxa fetal (AAP,1985; FAERK et al., 2000).

O metabolismo do zinco é complexo em RNBP. Teoricamente, a taxa de retenção fetal de 250µg/kg/dia poderia ser encontrada no consumo do leite da própria mãe. Contudo, quando o leite humano consumido é submetido a tratamento calórico, crianças RNBP podem permanecer num balanço negativo de zinco, até cerca de 70 dias de idade. Um equilíbrio positivo de zinco é possível no período pós-natal, quando a absorção de gordura se faz pela adição de 40-51%, sob a forma de triacilgliceróis de cadeia média. O Comitê de Nutrição da Academia Americana de Pediatria (AAP, 1985) propõe, para crianças nascidas a termo, 0,5mg de zinco e 5mg de magnésio por 100kcal, sugerindo que se mantenham os mesmos valores para RNBP.

Embora seja o leite materno considerado a melhor forma de nutrição, tanto para prover o zinco como para a sua absorção, existem relatos sobre deficiência de zinco em crianças de baixo peso alimentadas exclusivamente com leite materno (HEINEN et al., 1995).

SCHANLER (1995) argumenta que o uso do leite humano, mesmo em pequenas quantidades, pode ser benéfico para o amadurecimento do trato gastrointestinal. Sugere que, diante dos benefícios do leite humano, sobretudo o fator imunológico, deve haver todo empenho no sentido de se prover leite humano para a população de alto risco (RNBP).

Para NARAYANAN (1989), é melhor o crescimento do lactente que recebe o leite de sua própria mãe. Nestes casos, o enriquecimento com proteína pode aprimorar este crescimento.

Pesquisas realizadas por DINIZ (1991) demonstram que o melhor leite é o materno, e defende que sejam envidados esforços no sentido de ser ele adotado como alimentação preferencial.

O leite materno pré-termo parece ser o mais próximo das necessidades nutricionais do RNPT, em relação a leite materno de outros períodos ou idades gestacionais, como o coletado em Banco de Leite (GROSS et al., 1980).

Ainda não se dispõe de um acordo com relação ao melhor tipo de leite e melhor esquema alimentar para o RNBP. Do ponto de vista da composição da alimentação, há controvérsias sobre qual seria o leite ótimo para os RNBP. É curioso observar que durante o primeiro mês de lactação a composição do leite de mães com parto prematuro não é a mesma de quando o parto é a termo (LEMONS et al., 1982).

Alguns investigadores observaram que RNBP alimentados com leite humano apresentaram taxas de crescimento mais lentas, bem como inadequada ingestão de nutrientes em relação às suas necessidades específicas (ATKINSON et al., 1981; SCHANLER, 1995). Tem-se preconizado, por exemplo, o uso de fórmulas para RNBP, a fim de atender a suas necessidades fisiológicas e de nutrientes específicos. Nestas fórmulas, a quantidade de proteína fica aumentada e existe maior concentração de cálcio, fósforo e outros minerais, vitaminas e eletrólitos (ANDERSON, 1999).

No caso de lactentes com peso inferior a 1500g ao nascer, a alimentação exclusiva com leite humano tem resultado em taxas de crescimento insuficientes, associadas a carências nutricionais durante e além do período do tratamento hospitalar (SCHANLER, 1995; FRIEL et al., 1999). Há estudos que demonstram aumento das taxas de crescimento e das proteínas do soro (albumina), em crianças alimentadas com leite humano enriquecido apenas com proteínas (MORO et al., 1994; POLBERGER et al., 1989; SCHANLER, 1995). Outros estudos sugerem a necessidade de fortificantes com multinutrientes para alterar as taxas bioquímicas e de crescimento (SCHANLER et al., 1985; SCHANLER et al., 1987; GREER et al., 1988).

Segundo a AAP (1985), o leite de mães de crianças nascidas a termo não satisfaz todas as exigências dos RNBP, resultando daí uma taxa mais lenta de crescimento, cuja causa é provavelmente a baixa concentração de proteína. Quando crianças RNBP são alimentadas com leite humano a termo, ocorrem complicações metabólicas, incluindo hiponatremia (entre uma e cinco semanas), hipoproteinemia (entre oito e doze semanas) e raquitismo (cinco a seis meses). Por outro lado, consta que o leite das mães de prematuros apresenta, especialmente durante as primeiras duas

semanas após o parto, maior concentração de gordura, proteínas e sódio, mais calorias e menor concentração de lactose, cálcio e fósforo. Estas diferenças podem ser causadas principalmente pelo reduzido volume diário de leite produzido pelas mães de crianças de baixo-peso. Esta constatação tem levado ao desenvolvimento de fortificantes para o leite humano, aumentando-lhe o conteúdo nutricional pela adição de proteína, energia e minerais (CURTIS et al., 1999).

O reconhecimento de que o uso de suplementos nutricionais pode melhorar o crescimento do bebê e atenuar deficiências de nutrição despertou renovado entusiasmo pela ministração de leite humano a lactentes prematuros (SCHANLER, 1998).

Em relação às necessidades nutricionais do RNBP, as fórmulas cujo conteúdo protéico seja elevado e predominantemente às custas de caseína, como aquelas baseadas em leite de vaca (relação lactoalbumina/caseína de 20:80), podem provocar alterações metabólicas: hiperaminoacidemia, altos níveis plasmáticos de uréia, nitrogênio e amônia, bem como urina hiperosmolar, acidose metabólica tardia e baixos níveis plasmáticos de taurina, quando comparadas a casos de crianças alimentadas com leite humano, cuja relação lactoalbumina/caseína é de 60:40 (RAIHA et al., 1976). Geralmente a fração de proteínas do soro é digerida mais facilmente, promovendo um esvaziamento gástrico mais rápido, típico da alimentação com leite humano. Estudos clínicos que investigaram os benefícios do soro, em contraposição a leites ricos em caseína, constataram nestes concentração maior dos aminoácidos fenilalanina, tirosina, metionina, provavelmente em razão da imaturidade hepática para metabolizá-los. Estes mesmos estudos demonstraram, por outro lado, menor concentração destes aminoácidos em crianças RNBP alimentadas com leite humano (SCHANLER, 1995).

Segundo a Academia Americana de Pediatria (AAP, 1985), a ingestão de 120 kcal/kg/dia capacita o RNBP a alcançar taxas satisfatórias de crescimento. Para o Comitee on Nutrition of the Preterm Infant, European Society for Paediatr (ESPGAN, 1987), 130 kcal/kg/d deveriam satisfazer os requisitos de energia da maioria das

crianças que nascem com baixo peso, permitindo uma taxa de crescimento similar à que ocorre no útero, onde uma ingestão de 130 kcal pode ser alcançada com um volume de 150-200ml/kg/dia.

CLARK (1993) afirma serem similares aos do RN os requerimentos nutricionais dos RNBP. Existem, entretanto, algumas diferenças, relacionadas especialmente a aspectos de desenvolvimento e maturação do trato gastrintestinal, função renal e permeabilidade cutânea.

A Tabela 4 apresenta as necessidades do recém-nascido, segundo várias pesquisas.

TABELA 4 - NECESSIDADES NUTRICIONAIS DIÁRIAS PARA RECÉM-NASCIDOS DE BAIXO PESO

NUTRIENTES	AAP-1985	ZIEGLER ET AL. (1981)	NCCPS - 1995	ESPGAN - 1987
Calorias	120Kcal/ ou 100Kcal/dL	130Kcal/ ou 108Kcal/dL	105-135Kcal/ ou 88- 113Kcal/dL	110-130Kcal/ ou 85Kcal/dl
Proteínas	3,5-4,0g/Kcal ou 2,9- 3,3g/dL	3,5g/ ou 2,9g/dL	3,0-3,6g/ ou 2,5- 3,0g/dL	2,25- 3,0g/100Kcal
Cálcio	167mg/ ou 139mg/dL	185mg/ ou 154mg/dL	160-240mg/ ou 133- 200mg/dL	70- 140mg/100Kcal
Fósforo	114mg/ ou 63 mg/dL	123mg/ ou 102mg/dL	77mg/-64mg/dL	50-90mg /100Kcal
Magnésio	7,8mg/ ou 4,33mg/dL	8,5 mg/ ou 7,1 mg/dL	4,9-9,7mg/ ou 4,1- 8,1mg/dL	6mg/100Kcal
Sódio	62mg/ ou 50mg/dL	3,0mg/ ou 57 mg/dL	27-91mg/ ou 22,5mg-75mg/dL	6,5-15mmol/L
Potássio	90mg/ ou 50 mg/dL	89mg/ ou 73mg/dL	97-136mg/ ou 81- 113mg/dL	15-25mmol/L
Zinco	0,5mg/100Kcal ou 0,4 mg/dL	—	—	0,55mg/100Kcal
Lipídios	—	—	4,5-6,8g/ ou 3,75- 5,6g/dL	3,6-7,01/100Kcal
Carboidratos	—	—	7,5-15,5g/ ou 6,25- 12,91g/dL	8g/dL

FONTES: AAP: American Academy of Pediatrics - Comittee on Nutritional Needs of Low Birth Weight
 NCCPS: Nutrition Comittee, Canadian Paediatric Society - Nutrient Needs and Feeding of Premature Infants
 ESPGAN: European Society of Paediatric Gastroenterology in a Nutrition - Comittee On Nutrition of the Preterm Infant

2.2.1 Diferenças na Composição do Leite Humano

Muitos estudos efetuaram a comparação entre a composição de macronutrientes do leite pré-termo e os do termo. Entre as diferenças observadas, o leite pré-termo apresentou mais alto conteúdo de nitrogênio e valor nutricional maior que o do leite a termo (ATKINSON et al., 1978; GROSS et al., 1980; SCHANLER e OH, 1980; ANDERSON et al., 1981; GUERRINI et al., 1981; LEMONS et al., 1982; BUTTE et al., 1984; DARWISH et al., 1989; DAWODU et al., 1990).

Segundo VALDÉS et al. (1996), mulheres que têm um parto prematuro produzem, durante um ou mais meses, leite com teor mais elevado de proteínas e calorias, e mais baixo de lactose, em relação ao leite maduro.

Para MENA e MILAD (1998), as diferenças mais significativas entre o leite da mãe de pré-termo e termo são o conteúdo mais elevado, no primeiro, de sódio e proteína, provavelmente pela persistência da lactação paracelular.

MAAS et al. (1998) avaliaram a influência da idade gestacional na composição do leite. Seu estudo situa a idade pós-natal como determinante da maior mudança na composição do leite, ficando a idade gestacional como responsável pela mudança menor, não havendo influência da idade pós-menstrual.

Segundo GROSS et al. (1981), SCHANLER (1995) e POLBERGER et al. (1989), o leite de mães de filhos pré-termo (entre 28 e 36 semanas de gestação), produzido nas primeiras semanas, contém maior concentração de nitrogênio, sódio e cloro. Seus estudos demonstraram ser esta a composição mais adequada à promoção da taxa de crescimento de pré-termos. O mesmo trabalho constatou uma taxa mais lenta de crescimento para RNPT que receberam leite maduro, comparativamente àqueles que receberam fórmula láctea à base de leite de vaca.

O leite materno pré-termo produzido no período pós-parto, principalmente durante as quatro primeiras semanas, oferece vantagens nutricionais em função da sua alta concentração de proteínas e eletrólitos. Crianças alimentadas com leite pré-termo

apresentaram aumento do peso, altura e perímetro cefálico, tanto quanto níveis de retenção de proteína, gordura, sódio, potássio e cloreto comparáveis aos níveis apresentados por fetos em idade gestacional semelhante (PEREIRA e BARBOSA, 1986; BHATIA et al., 1991; GROSS, 1993).

Estudos de COPPA et al., em 1991, demonstraram que o leite de mães de RNPT difere do leite de mães de RN, pelo seu menor conteúdo de lactose e pelo maior número de oligossacarídeos. Segundo suas conclusões, à medida que o leite humano é paramentado para a manufatura industrial, maior atenção deve ser dada às suas características nutricionais.

HAMOSH et al., em 1985, relataram que o leite de mães de RNPT apresenta maior concentração de colesterol, fosfolípidios e ácidos graxos de cadeia longa, componentes estes associados à membrana do glóbulo de gordura e fundamentais para o desenvolvimento cerebral do recém-nascido. MATALOUN e LEONE (2000) definiram diferenças entre o leite de mães de RN e RNBP, do ponto de vista de cálcio e fósforo, com valores mais acentuados para o leite de mães de RNPT.

PAUL et al. (1997) avaliaram o conteúdo de energia e de macronutrientes no leite humano de mães de recém nascidos pré-termo, em relação ao de mães de bebês a termo. Observaram que a composição de macronutrientes se altera conforme o tempo de lactação. No grupo de pré-termos, o conteúdo de proteínas diminuiu nas três primeiras semanas, enquanto o teor de gordura e lactose aumentou com a idade pós-parto. No grupo de crianças a termo, as mesmas mudanças ocorreram, porém menos acentuadas. Concluíram que a composição do leite humano é altamente variável. Inicialmente rico em proteínas, estas vão-se reduzindo à medida que aumenta a idade pós-parto. Ao longo das semanas, aumenta a concentração de lipídios e lactose e, conseqüentemente, de energia.

ANDERSON (1984) observou aumento de 20 a 30% na concentração de gordura no leite de mães de RNPT, em relação ao caso de mães de RN.

SIMONIN et al. (1984) afirmaram que a concentração de lipídios das mães

de prematuros aumenta com o progredir da lactação, atingindo gradativamente níveis superiores aos de mães de recém-nascidos a termo.

BOERSMA et al. (1991) estudaram a composição de triacilgliceróis, colesterol, composição de ácido graxo e tocoferóis no colostro, leite de transição e leite maduro. Concluíram que, com o progresso da lactação, os triacilgliceróis e ácidos graxos de cadeia média aumentam, enquanto tocoferóis, colesterol e ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa diminuem.

FERRIS et al. (1988) demonstraram em seus estudos que a concentração de lipídios, nitrogênio e energia difere significativamente de mulher para mulher.

ALLEN et al. (1991) avaliaram as diferenças na composição dos nutrientes em função do tempo de lactação, encontrando considerável aumento de lactose, glicose, pH, cálcio ionizado, e significante redução de proteínas, sódio, potássio, cloro e cálcio, no período entre um mês e seis meses de lactação.

Outros estudos apontam igualmente uma considerável diferença na composição do leite, referente ao estágio de lactação (ATKINSON et al., 1978; GROSS et al., 1980; ATKINSON et al., 1981; ANDERSON et al., 1981, 1983; ATKINSON et al., 1983; BUTTE et al., 1984; PIERSE et al., 1988; JAIN e BIJLANI, 1989; LAWRENCE, 1994).

Muitos estudos têm demonstrado variação dos níveis de concentração dos elementos traços e minerais, em virtude das características maternas e do recém-nascido.

GRUMACH (1990) encontrou diferenças significativas nos níveis de magnésio e sódio, quando comparou o leite de mães de recém-nascidos de baixo peso ao de mães de bebês com peso ideal para o período de gestação.

CALIL (1990) observou sensível aumento do fósforo contido no colostro de mães de RNBP, comparado ao de mães de RNT.

Segundo LONNERDAL (2000), uma nutrição materna pobre parece não influir sobre proteínas, lipídios, carboidratos ou conteúdo calórico do leite. A dieta

materna não alteraria a taxa de minerais e elementos traços, com exceção do selênio e algumas vitaminas hidrossolúveis; ao contrário, as vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos livres seriam afetados, com exceção da vitamina A.

Para PAUL et al. (1997), a variabilidade da composição do leite materno pode estar influenciada pela dieta, estado nutricional, situação econômica e diferenças étnicas das mães. Para eles, a dieta materna determina a composição em gorduras e também, em menor grau, de proteínas.

A Tabela 5 apresenta alguns fatores que podem influir na composição e volume do leite materno.

TABELA 5 - FATORES QUE INFLUENCIAM AS MODIFICAÇÕES DA QUALIDADE DO LEITE HUMANO

FATOR: DIETA MATERNA	EFEITO
Menor consumo calórico	Redução do volume
Maior ingestão protéica	Aumento do nitrogênio protéico
Rica em carboidratos	Aumento de ácidos graxos de cadeia média
Rica em saturados	Aumento de saturados
Rica em polinsaturados	Aumento dos polinsaturados
Menor ingestão de zinco, iodo e flúor	Menor concentração no leite
Menor ingestão de vitaminas hidrossolúveis	Menor concentração no leite
Outros	
Tabagismo	Menor volume
Parto prematuro	Maior concentração de sódio e proteínas
Mastite	Maior concentração de sódio

FONTE: MENA e MILAD, 1998

Várias outras pesquisas têm demonstrado que a dieta materna e o nível sócio-econômico influenciam na concentração do leite humano (RAJALAKSHMI e SRIKANTIA, 1980; DANG et al., 1984; COELHO, 1988; BRASIL, 1988; FRANCO et al., 1987; ESCRIVÃO et al., 1996). Segundo ESCRIVÃO et al. (1996), a concentração de ferro, cobre, zinco, cálcio, fósforo e magnésio é bastante variável no início da lactação, mas estas variações no colostro não apresentam diferenças marcantes em relação ao nível sócio-econômico. Daí por que enfatizam a importância na promoção do aleitamento materno entre as populações de baixa renda.

COELHO e BRASIL, ambos em 1988, estudaram a composição química do

colostro e do leite maduro de adolescentes, podendo detectar concentrações mais elevadas de gorduras totais e valor calórico, em relação às adultas.

A Tabela 6 apresenta a composição do leite materno termo e pré-termo, durante os primeiros dias de lactação, e a de fortificantes para leite humano.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DE LEITE MATERNO TERMO E PRÉ-TERMO DURANTE OS 30 PRIMEIROS DIAS DE LACTAÇÃO E DE FORTIFICANTES DO LEITE HUMANO (PREPARADOS PARA 100ML DE LEITE)

COMPOSIÇÃO EM 100ML	LEITE TERMO	LEITE PRÉ-TERMO	EHMF	SNC	FM85
Energia (kcal)	67 - 73,6	71,0 - 76,0	85	76	85
Proteína (g)	1,2 - 1,8	1,5 - 2,1	2,5	2,0	2,0
Lipídios (g)	2,9 - 3,4	3,2 - 3,6	3,6	4,0	3,8
Carboidratos (g)	6,4 - 7,1	6,3 - 7,2	9,7	7,8	10,6
Sódio (mg)	15,4 - 21,8	21,8 - 39,1	23	25,3	49
Cloro (mg)	36,4 - 58,8	38,5 - 63,0			72
Potássio (mg)	50,7 - 65,5	53,4 - 67,0			75
Cálcio (mg)	26,7 - 29,3	26,6 - 31,4	112	97	82
Fósforo (mg)	13,8 - 16,9	12,9 - 13,8	59	50	49
Magnésio (mg)	2,7 - 3,1	3,0 - 3,6	3,5	6,3	6,7
Cobre (µg)	57,0 - 73,0	63,0 - 83,0			
Ferro (µg)	81,0 - 111,0	90,0 - 110,0			
Zinco (µg)	260,0 - 535,0	392,0 - 530,0			

FONTE: PEREIRA e BARBOSA (1986); SCHANLER (1998).

EHMF: Enfamil Human Milk Fortifier (Mead Johnson); SNC+ Similac Natural Care (Ross); FM85 (Nestlé).

Vasta é realmente a literatura sobre as diferenças entre o leite de mães de recém-nascidos a termo e o de mães de RNPT, além de outros fatores que podem interferir na composição do leite humano.

HUERTA et al. (1995) avaliaram a qualidade nutricional do leite humano obtido com bomba manual (BM) e bomba elétrica (BE). Concluíram que o instrumento utilizado para extrair o leite é fator determinante do seu volume e composição. O volume de leite extraído com a bomba elétrica foi maior que o do extraído, em igual tempo, com a bomba manual (BM). A concentração de lipídios mostrou-se estatisticamente diferente nos dois casos, sendo maior no leite obtido com BE, em relação ao da BM. Estes dados sugerem que a BE é um instrumento recomendado quando, por diferentes razões, as mães tenham que extrair seu leite, seja

para oferecer ao próprio filho ou para doar ao Banco de Leite.

2.2.2 Suplementação do Leite Humano

Nos casos de imaturidade mais pronunciada, cujo prognóstico há alguns anos era invariavelmente a morte, a alta tecnologia atual garante possibilidades de sobrevivência. "No caso de recém-nascidos e prematuros em especial, a qualidade do alimento é fundamental para sua sobrevivência" (BRASIL, 1998c). Para RNBP com permanência prolongada em terapia intensiva neonatal, foram desenvolvidos "fortificantes" e fórmulas especiais.

Os polímeros de glicose são utilizados para suplementação energética e como substitutos de lactose em fórmulas especiais (ISSLER, 1991). Devido à sua estrutura, produzem carga osmolar baixa e são digeridos facilmente por neonatos e lactentes.

As fórmulas infantis para RNPT, com maior concentração de energia e proteína, vêm sendo largamente utilizadas nas últimas décadas, permitindo crescimento semelhante ao intrauterino (REICHMAN et al., 1981; LUCAS et al., 1984). As fórmulas não possuem, porém, qualidade de proteína nem conteúdo de aminoácido iguais aos do leite humano. Novos estudos existem sobre o uso do leite enriquecido com proteína do leite humano. Nota-se então maior taxa de crescimento em relação à de crianças alimentadas com leite humano não fortificado (RAIHA et al., 1976; LUCAS et al., 1980; LUCAS et al., 1984; RONNHOLM, 1986).

POLBERG et al. (1999) avaliaram a evolução de RNBP que receberam leite humano fortificado com proteína humana ultrafiltrada ou à base de soro bovino. Em ambos os casos, os resultados bioquímicos e de crescimento mostraram-se similares.

Estudiosos reportam o benefício da suplementação com ácidos graxos polinsaturados (PUFA) em fórmulas de suplementação do leite humano para essa clientela. Resultados indicam os efeitos positivos no seu neurodesenvolvimento

(SCHANLER, 2001).

Como suplemento de gorduras, têm sido utilizados ácidos graxos insaturados de cadeia longa (acima de 12 carbonos). Triacilgliceróis de cadeia média são bem tolerados e estão presentes em muitas fórmulas. O ácido linoléico deveria responder, pelo menos, por 4,5% do total de energia, que corresponde a 0,5g/100 Kcal (ESPGAN, 1987).

SCHANLER (1995) comenta sobre a variedade de fórmulas para enriquecimento de minerais, onde se combinam fontes de lactato de cálcio, gluconato de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, dibásico e tribásico, glicerofosfato de cálcio. O lactato de cálcio contém 13% de cálcio elementar. O gluconato de cálcio (10% solução) provê 9mg Ca/mL. O glicerofosfato de cálcio provê 19% de cálcio e 15% de fósforo. O fosfato de sódio em pó contém 90mg de fósforo e 4mEq de sódio por mL. O caseinato de cálcio (1g de pó) provê 0,9g de proteína, 16mg de cálcio e 8mg de fósforo, podendo tornar-se adequado quando a proteína do soro for indisponível.

Para SCHANLER (1998), a suplementação mineral do leite humano durante a hospitalização previne contra a diminuição do crescimento linear e aumenta a mineralização óssea durante e além do período neonatal. A suplementação com cálcio e fósforo resulta na normalização de índices bioquímicos, como seus níveis séricos, atividade da fosfatase alcalina e excreção urinária. A suplementação de sódio resulta na normalização de sódio sérico. A suplementação de proteína e energia determina melhores taxas do ganho de peso e dos níveis de proteína nutricional: nitrogênio da uréia do sangue, albumina do soro, pré-albumina do soro.

CHAN (1993) averiguou o crescimento e a taxa mineral óssea do RNBP, mediante uma dieta contendo alto conteúdo de cálcio, após sua alta hospitalar. Os resultados deste estudo demonstraram que os que receberam leite humano sem fortificação após alta hospitalar (entre 8 a 16 semanas) tiveram menor curva de crescimento e menor taxa de mineralização óssea, comparados a RNBP alimentados com fórmulas ricas em cálcio (1290 mg/L).

Os resultados do uso de suplementos têm sido conflitantes. Alguns estudos apresentaram resultados positivos para a mineralização óssea (JAMES et al., 1986; CHAN et al., 1988; HORSMANN et al., 1989; CONGDON et al., 1990; LAPILLONE et al., 1994), enquanto outros não apontaram efeitos importantes, se comparados ao uso exclusivo do leite humano (GREER, 1988; VENKTARAMAN e BLICK, 1988; GROSS, 1987). As pesquisas de FAERK (2000) concluíram que o leite humano suplementado com minerais ou o uso de fórmulas para pré-termos não aumenta significativamente a mineralização óssea, quando o lactente é alimentado com 200mL/kg/dia.

Outros estudos indicam que a taxa de crescimento de RNBP é mais alta quando alimentados com leite pré-termo, comparados àqueles alimentados com leite proveniente de Banco de Leite e igual a fórmulas infantis específicas para esta clientela (ATKINSON et al., 1981; CHESSEX et al., 1983; GROSS, 1983; SCHANLER et al., 1985).

MODANLOU et al., em 1986, compararam os resultados do leite humano suplementado aos do leite humano não suplementado. Os prematuros que receberam o primeiro apresentaram maior velocidade de crescimento. A tolerância ao leite foi similar em ambos os casos.

Estas conclusões vêm ao encontro de outros dados que demonstram que os RNBP, em relação aos RN, necessitam de quantidades maiores de certos ingredientes nutricionais, sobretudo proteínas, sódio, cálcio, fósforo e calorias (ANDERSON 1999).

McCLURE e NEWELL (1996) avaliaram a adição de um fortificante ao leite humano (enriquecido em calorias, proteínas e minerais), investigando se a medida poderia afetar o esvaziamento gástrico de RNBP. Seus estudos não apontaram diferenças, ou seja, o leite humano enriquecido não retarda o esvaziamento gástrico, esta prática não afeta a tolerância alimentar no RNBP.

EWER e VYH (1996) demonstraram, ao contrário, que a adição de

fortificante ao leite humano pode retardar significativamente o esvaziamento gástrico, apesar da adição do fortificante melhorar o crescimento e a mineralização óssea. Seus estudos restringem-se a um único fortificante comercial (FM-85, Nestlé), o que leva a crer que outros fortificantes, com diferentes composições e aumento calórico, podem ter resultados diferentes. Eles sugerem a realização de novos estudos, a fim de evitar complicações de intolerância, principalmente nos primeiros dias de introdução da alimentação enteral.

GUERRINI (1994) comparou dois grupos de lactentes, para avaliar crescimento e taxas bioquímicas: um grupo de RNBP recebendo leite humano enriquecido com proteínas de leite bovino (40% soro e 45% caseína) e aminoácidos (15%), de composição similar à fração protéica do leite humano; outro grupo, formado de lactentes de baixo peso, recebendo fórmula com alta densidade calórica (840 kcal/L). Constatou-se que os lactentes alimentados com leite humano fortificado apresentaram maior nível de cálcio no soro, comparados ao grupo recebendo fórmula de alta densidade calórica. Os resultados para ganho de peso, estatura e circunferência craniana foram similares. O autor concluiu que esforços devem ser mantidos no sentido de garantir o uso do leite humano, cujos benefícios são indiscutíveis, porém suplementado, a fim de satisfazer os requerimentos específicos do RNBP.

WARNER et al. (1998) investigaram a eficácia de leite humano enriquecido com polímeros de glicose, uma mistura de frações de proteína de leite bovino e aminoácidos, e também minerais e vitaminas. Os resultados indicaram que, no caso de RNBP (menos de 1500g ao nascer), a redução do crescimento é amenizada pela adição ao leite humano de um suplemento que aumente calorias, proteínas e minerais.

GAMSUM e NICHOLL (1999) e PORCELLI et al. (2000) estudaram os efeitos da adição de um fortificante preparado comercialmente para leite humano, recomendado para lactentes de baixo peso (enriquecido em calorias, proteínas e minerais). Foram avaliadas mudanças no crescimento, ganho de peso e índices bioquímicos de nutrição. Todos os bebês que receberam leite fortificado mostraram

significativo aumento no crescimento durante o período estudado, não se constatando eventos adversos.

MORO et al. (1994) estudaram o uso de diferentes fortificantes acrescidos ao leite humano, para recém-nascidos de baixo peso. Os resultados foram positivos para o crescimento e ganho de peso.

POLBERGER et al. (1989) concluíram em seus trabalhos que uma ingestão de 3g/kg/dia e 120 Kcal/kg/dia de proteína e energia, respectivamente, permite ganho de peso equivalente ao intrauterino. Valores acima destas taxas não demonstraram maiores benefícios.

MOODY et al. (2000) avaliaram a tolerância de RNBP ao leite humano fortificado. Os 67 bebês avaliados (com peso ao nascer entre 1065g a 1800g, e idade gestacional entre 27+/-0,8 semanas) apresentaram significativo aumento do crescimento, sem efeitos gástricos e cardíacos adversos.

KUSCHEL e HARDING (2000) estudaram a suplementação do leite humano, objetivando a melhoria no crescimento de prematuros, além de investigar a ocorrência de efeitos adversos desta prática. Concluíram que a suplementação do leite humano resultou no encurtamento do tempo para ganho do peso, sem efeitos sobre níveis de fosfatase alcalina no soro. Ocorreu aumento do mineral ósseo e nitrogênio retido. Não apareceram efeitos adversos.

CURTIS et al. (1999) argumentam que a adição do fortificante ao leite humano oferece várias vantagens, incluindo aumento do crescimento e da mineralização óssea, assim como redução na incidência de hiponatremia. Os RNBP alimentados com leite humano podem, entretanto, desenvolver distensão abdominal, redução do esvaziamento gástrico, evacuações frequentes e, raramente, diarreia. Em função disso, a suplementação deve ser avaliada, levando-se em conta o considerável aumento da osmolaridade.

A nutrição de RNBP é fundamental para seu desenvolvimento. Muitos estudos devem ainda ser realizados, tendo-se em vista maior segurança no tratamento

dietoterápico específico, em tais casos. O leite humano modificado em algumas características (BRASIL, 1998b) manteria os benefícios inequívocos de sua composição, levando ao crescimento e à incorporação de nutrientes em níveis mais desejáveis.

2.3 BANCO DE LEITE HUMANO

Os bebês RNBP geralmente são mantidos hospitalizados por muitas semanas. Embora as mães sejam encorajadas a ordenharem seu leite para os filhos, o estresse e a ansiedade podem causar a interrupção da produção do mesmo. Uma das alternativas é a utilização de leite de Banco de Leite, escolhendo-se doadora com idade de lactação de até 8 semanas (leite mais rico em proteínas), que apresente ótima concentração de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (LUUKKAINEN et al., 1995).

Quando a mãe não tem condição de amamentar, o mais indicado é a utilização do leite materno estocado no Banco de Leite, rigorosamente controlado, inclusive com triagem de doadoras, que se torna muito útil para o início da alimentação do RNBP, nesses casos em que a mãe esteja impossibilitada de fornecer leite, ou para o uso associado a fórmulas que enriqueçam os componentes nutricionais. O leite humano de Banco pode, ainda, ser submetido à homogeneização ultra-sônica, para que ocorra melhor aproveitamento de gorduras: concentrado e processado, para ser utilizado como fortificante do próprio leite humano (PINHATA e GONÇALVES, 1996).

No decurso das últimas décadas no Brasil, os Bancos de Leite têm sido um dos mais importantes elementos estratégicos da política estatal em favor da amamentação. Surgiram desde o final dos anos 30, e até 1981, quando da implantação do Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno - PNIAM. Mas não chegaram a constituir um fator representativo em saúde pública (BRASIL, 1981).

A partir daí, especialmente na segunda metade da década de 80, o Brasil experimentou uma expansão inesperada, tornando-se motivo de preocupação para o PNIAM, devido à proliferação desordenada, sem atender a objetivos e procedimentos uniformes, contatando-se, entre outros fatos, a compra e venda do leite humano, a sua troca por cestas alimentícias e a falta de controle de qualidade do produto (BRASIL, 1998c). Diante dessa realidade, o PNIAM (1991) reuniu técnicos que se encontravam à frente dos BLHs para, mediante a troca de experiências, formularem normas que abalzassem a conduta dessas unidades e garantissem procedimentos uniformes, desde a coleta até a distribuição, oferecendo um produto de qualidade, sob o ponto de vista de saúde pública.

O resultado do esforço de aproximadamente três anos foi concluído com a assinatura da Portaria SVS/MS nº 322/88, a qual contemplou todas as etapas de implantação e funcionamento de Bancos de Leite Humano e tornou o Brasil o primeiro país a possuir tal instrumento legal (BRASIL, 1998a).

Em 1992, foi criada a Comissão Central de Bancos de Leite Humano, como instância do Ministério da Saúde, responsável pelo assessoramento na formulação e implementação da política estatal para o setor.

A qualidade dos produtos processados, estocados e distribuídos pelos Bancos de Leite deve ser fruto de um esforço inteligente e constante, em todas as etapas, até a distribuição. Sob o ponto de vista da saúde pública, a qualidade tem um sentido amplo, incluindo características responsáveis pelo valor biológico do produto e pela segurança do consumidor. O leite humano processado em Banco de Leite deve, portanto, ser um produto de qualidade preservada e constante, desde a coleta até o consumo, de baixo custo e com o mínimo de riscos para a saúde de sua clientela (BRASIL, 1998d).

A rede de Bancos de Leite Humano vem sendo construída progressivamente. Os investimentos em pesquisa permitiram que o Centro de Referência Nacional e o Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz desenvolvessem metodologias de controle de qualidade adaptadas às típicas necessidades nacionais,

bem como seguras e sensíveis o suficiente para serem praticadas na rotina.

Diante de vários esforços, vale ressaltar que os Bancos de Leite Humano no Brasil constituem um motivo de perplexidade e orgulho, e seu valor se faz reconhecido internacionalmente (ALMEIDA,1999).

2.4 MODIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS DE PROTEÍNAS: HIDROLISADOS

A modificação enzimática das proteínas dos alimentos é uma técnica muito antiga, utilizada para melhorar a palatabilidade e estabilidade no armazenamento de fontes protéicas. Desde 1940, os hidrolisados protéicos são utilizados com finalidades médicas para manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas, mas foi na década de 70 que se manifestou o seu expressivo crescimento, o qual tem aumentado ao longo dos últimos anos, seja por seus aspectos nutricionais e clínicos, seja pela melhoria das propriedades funcionais das proteínas.

A hidrólise controlada permite a obtenção de produtos com características adequadas a uma dada aplicação (LEE, 1992; CORDLE, 1994; MAHMOUD, 1994; SCHMIDL et al., 1994; NOVO NORDISK, 1995; VAN WILLIGE e FITZERALD, 1995; PANYAM e KILARA, 1996; TOSSAVAINEN et al., 1996; CANDIDO, 1998):

- a) produtos nutricionalmente modificados, especialmente para nutrição enteral e parenteral, para crianças e para determinadas patologias;
- b) implementação de propriedades funcionais;
- c) suplementação e obtenção de novos produtos alimentícios;
- d) componentes de sabor;
- e) redução do potencial alergênico de alimentos.

A alergia a proteínas do leite bovino e de soja é comum em crianças. Para promover os sintomas alérgicos, são suficientes quantidades muito pequenas das proteínas. A beta-lactoglobulina é um dos principais componentes alergênicos do soro de leite bovino. Alergia ao leite pode resultar do uso direto de uma fórmula que

contenha proteína bovina ou mesmo do leite de mães que o ingeriram. Além disso, 8-35% de crianças alérgicas ao leite bovino também têm reações alérgicas à proteína de soja (LO e KLEINMAN, 1996). Fórmulas hipoalergênicas baseadas na hidrólise extensiva das proteínas bovinas ampliam o potencial de aplicação, especialmente de produtos para alimentação infantil (VAN WILLIGE e FITZERALD, 1995; TOSSAVAINEN et al., 1996).

MALLET e HENOCQ (1992) estudaram o efeito preventivo de uma fórmula com hidrolisado protéico, em crianças com história familiar de alergia. Concluíram ser recomendável o uso extensivo do hidrolisado protéico, em caso de criança com alto risco de alergia alimentar, que não recebe exclusivamente o leite humano e necessita de suplemento alimentar. Observaram que a frequência de doença alérgica em crianças que receberam fórmula de hidrolisado protéico representa a metade, em relação às que receberam outras fórmulas. As chances de distúrbios cutâneos foi significativamente menor nos primeiros 4 anos de vida. Entretanto, as mudanças de dieta não beneficiaram a prevenção de doença alérgica respiratória.

Muitas fórmulas de leite bovino foram modificadas, numa tentativa de reduzir-lhes a alergenicidade. As modificações incluem o uso de caseína hidrolisada e, mais recentemente, proteína de soro de leite hidrolisado. Algumas proteínas do leite de cabra têm reação igual às do leite de vaca, sendo que uma elevada proporção de crianças alérgicas ao leite de vaca também não tolera leite de cabra. Uma dieta elementar baseada em aminoácidos sintéticos ou uma fórmula baseada em proteínas hidrolisadas pode ser prescrita para crianças com potencial alérgico ao leite. Embora hidrolisados de soro e outras fórmulas novas possam ser satisfatórias para a alimentação da criança, precauções devem ser tomadas ao prescrevê-las, quando houver histórico familiar de alergia ao leite bovino (MARK et al., 1991).

Têm sido realizadas pesquisas sobre o uso de proteínas do leite bovino como ingrediente nutricional em leite modificado, buscando torná-lo similar ao leite humano (fórmulas infantis) ou com funções dietéticas. A composição do leite bovino difere em

muitos aspectos do leite humano, mas é a melhor opção como matéria-prima para fórmulas infantis. A principal modificação do leite bovino para se adaptar ao lactente é a redução da relação entre caseína e proteína do soro de 80:20 para 40:60. Nestas fórmulas a caseína pode estar presente como micelas de caseína ou caseinato (WIT, 1998).

Ainda segundo WIT (1998), também merecem cautela os aspectos nutricionais da composição de aminoácidos essenciais. A composição de aminoácidos em fórmulas parece representar um fator crítico para a nutrição de crianças recém-nascidas. As diferenças mais importantes prendem-se às baixas concentrações de cisteína e triptofano nas fórmulas à base de proteína bovina. As concentrações de alguns outros aminoácidos essenciais, como lisina ou treonina, são significativamente mais altas em fórmulas infantis, se comparadas ao leite humano.

GUILLOU et al. (1992) avaliaram, em 60 lactentes recém-nascidos saudáveis, uma fórmula láctea parcialmente hidrolisada, denominada hipoalergênica. Constataram que suas qualidades nutricionais são semelhantes àquelas que contêm proteínas integrais, sem o aparecimento de distúrbios digestivos importantes.

VANDENPLANS et al. (1993) ministraram fórmulas de hidrolisado de soro de leite a recém-nascidos saudáveis, comparando-as a fórmulas de soro (caseína/soro de 40/60). Avaliaram o ganho de peso, estatura e dados laboratoriais, não detectando diferenças significativas entre os dois casos, apesar do hidrolisado apresentar-se ligeiramente mais adequado, levando-se em conta ter sido menor sua ingestão em quilogramas.

É necessária a combinação de testes não clínicos durante a manufatura dos hidrolisados de soro de leite, com o objetivo de caracterizar a molécula e as propriedades imunológicas do produto. A combinação de testes físico-químicos e imunoquímicos oferece informações específicas do produto, como a extensão da hidrólise e a estimativa do resíduo antigênico (LEARY, 1992).

2.5. EFEITOS DA FORTIFICAÇÃO DO LEITE HUMANO

LUCAS et al. (1990) determinaram que o uso de leite humano enriquecido não está associado com infecções ou enterocolite necrotizante. Quando, entretanto, ocorreu a combinação dos dois distúrbios, o grupo alimentado com leite humano enriquecido apresentou mais eventos. Em neonatos alimentados com leite humano fortificado ocorreu aumento na incidência de enterocolite necrosante (5,8% contra 2,2% do grupo controle). Embora a diferença não seja significativa, os autores sugerem novos estudos para avaliação dos dados.

QUAN et al. (1994) examinaram o impacto da adição de suplementos sobre as características benéficas do leite humano. Suas investigações sugerem que alguns tipos de suplementos podem interferir negativamente nas propriedades anti-infecciosas do leite humano, na sua composição. O exato mecanismo destes efeitos não é claro; possivelmente é causado pela ligação entre os anticorpos ou lisozimas e as substâncias (tais como proteínas) contidas nestas fórmulas.

JOCSON et al. (1997) estudaram os efeitos da fortificação e da estocagem sobre as propriedades imunoprotetoras do leite humano. Observaram que o total da concentração de IgA não foi afetado pela fortificação de nutrientes, pela temperatura e pelo tempo de estocagem. Seus estudos também revelam que a adição de um fortificante não inibe a atividade natural antiprotease do leite, não aumenta a atividade de lipólise e/ou degradação protéica. Recomendam, porém, o uso do leite fortificado dentro do período de 24 horas após sua preparação, em função do aumento do total de colônias bacterianas encontradas após este período.

CURTIS et al. (1999) demonstraram que a adição de fortificantes (comerciais - ver página 31) ao leite humano aumentou significativamente a osmolaridade. Este efeito depende do fortificante utilizado, podendo ser justificado pela atividade da amilase do leite humano, em relação ao conteúdo de dextrina dos fortificantes estudados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo constituiu-se de duas fases. Na primeira, procedeu-se à análise do perfil nutricional do leite humano processado em Banco de Leite e análise microbiológica do leite estocado em Banco de Leite. A segunda fase constou do desenvolvimento de um suplemento que adequasse a composição deste leite às necessidades do RNBP, seguido de novas análises microbiológicas, de IgA e da atividade de água do suplemento. As atividades referentes à pesquisa com leite humano e sua manipulação foram analisadas e devidamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

3.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES

3.1.1 Matéria-prima e Reagentes utilizados na Fase da Avaliação do Perfil Nutricional e Microbiológico

3.1.1.1 Matéria-prima

Leite humano pasteurizado estocado em Banco de Leite. As amostras foram obtidas do Banco de Leite do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e do Banco de Leite do Município de Ponta Grossa. Para análise de macronutrientes, foram testadas 46 amostras, em triplicata, obtidas de diferentes doadoras. Deste total, 26 foram classificadas como leite maduro (LM), 10 como colostro (LC) e 10 provenientes de mães de recém nascido pré-termo, com 36 semanas ou menos (LPT). Para análise de micronutrientes minerais, foi utilizada parte das referidas amostras, sendo 10 classificadas como leite maduro, 10 como colostro e 10 como pré-termo. O volume das amostras variou entre 60-80mL. As análises foram realizadas no laboratório de pós-graduação do Departamento de Nutrição/UFPR em Curitiba.

Da amostra, recebida em estado líquido e previamente pasteurizada, procedeu-se imediatamente à análise de gordura e proteínas, sendo preparado um filtrado para análise de lactose. O restante da amostra foi congelado, para as análises dos minerais.

Foram coletadas outras 20 amostras, submetidas a análises pelo método do crematócrito (LUCAS et al., 1978) e pelo método do Butirômetro de Gerber, considerado método padrão para dosagem de gordura em leite, avaliando-se estatisticamente as possíveis diferenças.

3.1.1.2 Equipamentos

Agitadores, balança eletrônica (GEHAKA-BG100), banho-maria (DELEO), espectrofotômetros (FEMTO-482), digestor e destilador de Kjeldahl (VELPS CIENTÍFICA-VDK140), estufa, centrífuga de Gerber (ITR); microcentrífuga; espectrofotômetro de absorção atômica (VARIAN); chapa de aquecimento, forno tipo mufla; câmara de fluxo laminar; autoclave; demais equipamentos, vidrarias e material de uso corrente em laboratório.

3.1.1.3 Reagentes e soluções

Os reagentes de grau analítico utilizados foram: lactose (PA), solução de tungstato de sódio, reativo alcalino de cobre, ácido fosfomolibdico, ácido sulfúrico, álcool isoamílico, ácido nítrico, ácido ascórbico (5%), solução sulfomolibdica, padrão de fósforo, magnésio, cálcio, sódio, potássio, zinco, peróxido de hidrogênio, óxido de lantânio (1%), cloreto de potássio (19%), meios de cultura, água destilada e deionizada.

3.1.2 Material e Reagentes utilizados na Fase do Desenvolvimento do Suplemento

3.1.2.1 Matéria-prima

Para o preparo da formulação foram utilizados os seguintes ingredientes: hidrolisado de proteína de concentrado de soro de leite, como fonte protéica, e minerais aminoácidos quelatos, como fonte de minerais. Manteve-se a preocupação de selecionar ingredientes de qualidade e normalmente disponíveis no mercado, a fim de possibilitar sua reprodução na prática dos Bancos de Leite.

3.1.2.2 Equipamentos e materiais:

Câmara de fluxo laminar; balança analítica; medidor de atividade de água; estufa; autoclave; placas de Petri; placa de imunodifusão radial; meios de cultura, demais equipamentos, vidrarias e material de uso corrente em laboratório.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Acompanhamento das Atividades de Produção de Leite em Banco de Leite

Foram acompanhadas todas as atividades do Banco de Leite, da coleta ao armazenamento do leite processado, durante 15 dias, totalizando 36 horas.

Foram observadas todas as rotinas relacionadas à coleta, armazenamento prévio, transporte, processamento, armazenamento, distribuição, controle de qualidade e esterilização de material.

3.2.2 Análise de Macronutrientes:

3.2.2.1 Lipídios totais:

Foram analisados pelo método de butirômetro de Gerber (ADOLFO LUTZ, 1985).

O processo de Gerber é baseado na propriedade do ácido sulfúrico de dissolver a caseína do leite, sem atacar a matéria gorda, quando em concentração determinada.

O ácido sulfúrico ($d=1,825$ g/mL) dissolve as proteínas que se encontram ligadas às gorduras, diminuindo a viscosidade do meio, aumentando a densidade da fase aquosa e fundindo a gordura, devido à liberação de calor proveniente da reação, o que favorece a separação de gordura pelo extrator (álcool isoamílico $d=0,811$ g/mL).

A leitura é realizada na escala graduada do butirômetro, após centrifugação (4-5min./1200-1400 r.p.m) e imersão em banho-maria (65°C -3min.).

O método do crematócrito constitui um critério de classificação do leite humano, que utiliza o parâmetro mensurável descrito por LUCAS et al., em 1978. Baseia-se na técnica do micro-hematócrito e determina o conteúdo gorduroso e energético do leite humano. A gordura (e substâncias lipossolúveis) separa-se pela ação centrífuga e por diferença de densidade, obtendo-se uma fração esbranquiçada denominada creme.

Foram utilizadas 20 amostras em triplicata, cedidas pelos Bancos de Leite do Hospital de Clínicas e pelo Banco de Leite do Município de Ponta Grossa.

Após o degelo e pasteurização do leite previamente homogeneizado, foi coletada uma amostra de 1mL em tubo de ensaio (para o crematócrito) e outra de 35mL em vidro estéril (para o butirômetro de Gerber). As análises do crematócrito foram realizadas nos próprios Bancos de Leite; as de Gerber, no laboratório de pós-graduação do Departamento de Nutrição da UFPR.

Para a análise pelo método do crematócrito, as amostras do tubo de ensaio foram conservadas em temperatura média de 37°C , homogeneizadas e transferidas, em triplicata, para tubo capilar, fechado numa das extremidades com massa de modelar; levado à microcentrífuga e submetido a alta rotação por 6 minutos.

Na parte superior do tubo acumulava-se o creme, de cor esbranquiçada. Com o auxílio de uma régua, procedeu-se à leitura, em milímetros, do comprimento desta

coluna-creme, seguida da leitura da coluna total (creme e soro).

Para o cálculo do resultado final, foram empregadas as seguintes fórmulas, descritas nas Recomendações Técnicas para o Funcionamento de Bancos de Leite (BRASIL, 1998b):

$$\text{Teor de Creme (\%)} = \frac{\text{Coluna de creme (em mm)}}{\text{Coluna total de produto (em mm)}} \times 100$$

$$\text{Teor de Gordura (\%)} = \frac{\text{Teor de Creme (\%)} - 0,59}{1,46}$$

Os valores encontrados nos dois métodos foram então comparados, para se avaliar a representatividade desta análise em relação ao método de Gerber.

3.2.2.2 Proteínas

O método de Kjeldahl (ADOLFO LUTZ, 1985) desenvolve-se em três etapas. Utilizou-se especificamente o equipamento VELP® Scientifica. Na primeira fase, promoveu-se a oxidação (digestão) da amostra, a quente, pelo ácido sulfúrico, em presença de catalisadores, rompendo-se a estrutura protéica para a liberação do nitrogênio sob a forma de sais de amônio. Esta digestão foi feita em tubo de Kjeldahl, em aquecimento elétrico a 420°C, por volta de 40 minutos.

Na segunda fase, foi adicionado hidróxido de sódio (40%) ao resíduo obtido na primeira fase, obtendo-se amônia, destilada a seguir e captada por ácido bórico (adicionado de indicador), com o qual reage para formar metaborato de amônio.

Na terceira fase, este sal foi titulado com ácido sulfúrico (0,2N), representando a fração nitrogenada que se desejava determinar.

No cálculo final de proteína, usou-se o fator 6,38 de conversão para o leite, com base na seguinte fórmula:

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{(\text{Va}-\text{Vb}) \cdot \text{fc. N. F. } 0,014 \cdot 100}{\text{P}}$$

Va = volume de ácido gasto na amostra

Vb = volume de ácido gasto no branco

Fc = fator de correção do ácido

N = normalidade do ácido

F = fator de conversão de nitrogênio em proteína

0,014 = miliequivalente-grama do nitrogênio

P = peso da amostra em gramas

3.2.2.3 Lactose

O método de Folin Wu (TRIEBOLD, 1963) baseia-se na redução dos íons cúpricos a íons cuprosos, pela lactose (açúcar redutor), em meio alcalino a quente (alcalino de cobre).

Inicialmente, a 1mL da amostra de leite foi adicionado tungstato de sódio e ácido sulfúrico, que precipitaram as proteínas (estas funcionam também como agente redutor), interferindo no resultado. Esta amostra foi então filtrada.

A uma alíquota do filtrado acrescentou-se reativo alcalino de cobre. A lactose reduziu o cobre, formando óxido de cobre.

A seguir, adicionou-se o reativo de Folin Wu, composto de ácido fosfomolibdico. O óxido de cobre reduz este ácido, chegando-se ao óxido de molibdênio, de cor azul.

O produto final foi então medido em um espectrofotômetro, juntamente com a curva padrão de lactose.

3.2.2.4 Calorias:

Para os dados referentes a calorias, foi utilizada a somatória dos valores calóricos referentes à proteína e lactose, considerando-se:

- 1g de proteína = 4kcal

- 1g de carboidrato = 4kcal

- 1g de lipídio = 9 kcal

3.2.3 Análise de Minerais

Foram analisados os minerais: cálcio, zinco, potássio, sódio, magnésio e fósforo.

A leitura dos cinco primeiros foi realizada no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA-UFPR). A do fósforo, no laboratório de pós-graduação do Departamento de Nutrição/UFPR.

As amostras foram preparadas no laboratório de pós-graduação do Departamento de Nutrição/UFPR, sendo que toda a vidraria e materiais utilizados foram imersos em ácido nítrico a 20%, durante duas horas, e enxaguados diversas vezes em água destilada e deionizada.

3.2.3.1 Fósforo

O fósforo foi determinado via método colorimétrico, utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis.

Foi utilizado especificamente o método colorimétrico do ácido fosfovanadomolibdico (GRANER et al., 1976), que se baseia na formação de um composto amarelo, em meio ácido (ácido clorídrico), através da reação entre íons fosfato, molibdato e vanadato.

3.2.3.2 Cálcio, Potássio, Sódio, Zinco, Magnésio

Estes minerais foram determinados via espectroscopia de absorção atômica (AOAC, 2000).

3.2.3.3 Preparação das amostras

Foram digeridas com ácido nítrico concentrado, utilizando-se um balão de Soxhlet de 250mL, acoplado a um sistema de refluxo com aquecimento, sendo filtradas e adicionadas de óxido de lantânio (1%) e cloreto de potássio (19%), a fim de eliminar interferências.

A Tabela 7 apresenta os parâmetros utilizados para cada mineral estudado.

TABELA 7 - PARÂMETROS INSTRUMENTAIS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE MINERAIS

MINERAL	CORRENTE LÂMPADA (mA)	COMBUSTÍVEL	SUORTE	COMP. ONDA (nm)	EXTENSÃO (nm)
Cálcio	10	Acetileno	Óxido nitroso	422,7	0,5
Potássio	5	Acetileno	Ar	766,7	1,0
Magnésio	4	Acetileno	Ar	285,2	0,5
Sódio	5	Acetileno	Ar	589,0	0,5
Zinco	5	Acetileno	Ar	213,9	1,0

3.2.4 Análise Microbiológica

Na fase 1, analisou-se o perfil microbiológico do leite produzido em Banco de Leite. Foram analisadas 05 amostras (em duplicata) de leite maduro processado. As amostras, recebidas congeladas, da mesma forma como os serviços de neonatologia recebem e estocam o leite, foram descongeladas em geladeira doméstica (temperatura média 5°C), por um período de 12 horas, aquecidas depois em banho-maria. Esta primeira etapa foi definida como tempo “zero”.

As amostras retornaram à geladeira, onde permaneceram armazenadas por mais 12 horas, repetindo-se os procedimentos anteriores (tempo “12”).

Da mesma forma se procedeu com as amostras armazenadas por 24 horas após o descongelamento (tempo “24”).

Estes procedimentos tiveram como objetivo simular a rotina de administração do leite em serviços de neonatologia.

Foram realizadas, na fase 2, análises microbiológicas (em duplicata) do leite pasteurizado produzido em Banco de Leite e do leite pasteurizado enriquecido com o suplemento desenvolvido, a fim de se observar se a manipulação do suplemento na rotina do Banco de Leite poderia interferir na qualidade microbiológica.

Todas as análises seguiram os padrões microbiológicos descritos na Resolução nº 12/2001 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), específicos para leite materno de Bancos de Leite. Foram realizadas no Laboratório de

Microbiologia do Centro Federal de Educação Tecnológica de Ponta Grossa, PR.

Com base no referido regulamento técnico, foram analisados microrganismos aeróbios mesófilos viáveis/mL; coliformes a 35°C/mL; *Staphylococcus* coagulase positiva/ml e *Salmonella* sp/25mL, tendo-se por base a metodologia apresentada pela *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 1980).

Para a análise dos mesófilos, *Staphylococcus* e coliformes, foram diluídos 25mL das amostras de leite pasteurizado e de leite pasteurizado suplementado, em 225mL de água peptonada a 0,1%.

Para a análise de *Salmonella*, outros 25 mL das amostras foram diluídos em 225mL de água destilada peptonada tamponada a 1%, para pré-enriquecimento.

3.2.4.1 Contagem de Aeróbios Mesófilos viáveis/mL

Foi distribuído 1mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) em placas de Petri estéreis e devidamente etiquetadas. O meio de cultura, *Plate Count Ágar* (PCA), foi vertido nas placas com o inóculo, num volume médio de 15 - 20 mL por placa. Para misturar o inóculo ao meio de cultura, as placas foram movimentadas suavemente, em superfície plana, sendo os movimentos circulares, em sentido horário e anti-horário (método de semeadura *Pour plate*). Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram invertidas e incubadas a 37°C, por 48 horas.

Para contagem de colônias típicas, deveriam ser observadas as colônias brancas ou de cor creme, pequenas e compactas. Para calcular o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL da amostra, multiplica-se o número de colônias típicas encontradas nas placas pelo inverso da diluição inoculada (UFC/mL).

3.2.4.2 Grupo Coliformes

Foi distribuído 1mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) em placas de Petri estéreis e devidamente etiquetadas. O meio de cultura utilizado, Ágar Vermelho

Violeta Bile (VRBA), foi vertido nas placas com o inóculo, num volume médio de 15 - 20 mL por placa, efetuando-se procedimento igual ao acima escrito.

Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C, por 24 horas.

Para contagem de colônias típicas, observam-se as colônias vermelho púrpura, com 0,5mm ou mais de diâmetro, rodeadas por um halo avermelhado de precipitação de sais biliares, multiplicando-se o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada (UFC/mL).

Para confirmação da presença de *Escherichia coli*, é ainda necessário passar as colônias típicas para o Fluorocult, incubar por mais 24 horas a 35°C, a fim de se verificar a fluorescência sob luz ultravioleta.

Foram realizadas semeaduras em placas Petrifilm, visando confirmar o resultado das análises pelo método convencional. As placas Petrifilm são fabricadas e comercializadas pela 3M Company, EUA, constituindo-se de cartões de papel quadriculado, revestidos de polietileno e recobertos com nutrientes desidratados e géis hidrossolúveis a frio. As placas Petrifilm apresentam ainda um filme plástico superior transparente, revestido internamente de agentes gelificantes hidrossolúveis a frio e um corante indicador. Para inoculação, utilizou-se igualmente o mesmo índice de 1mL das diluições realizadas nas placas de Petri. Foi aplicado, também, um difusor plástico para distribuir a amostra uniformemente pela placa Petrifilm, e em seguida incubou-se a 37°C, por 24 horas.

3.2.4.3 *Staphylococcus* coagulase positiva:

Foi inoculado 0,1mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar *Baird Parker* já solidificado. O inóculo foi espalhado com uma alça de Drigalski, das placas de maior para as placas de menor diluição (método de semeadura em superfície com alça de Drigalski). Aguardou-se até a absorção completa do excesso de líquido, quando as placas foram então invertidas e

incubadas a 37°C, por 48 horas.

Para contagem de colônias típicas, deveriam ser observadas as colônias circulares, pretas, pequenas (diâmetro máximo 1,5mm), lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente, a serem ainda submetidas à prova da coagulase para confirmação da presença de *Staphylococcus* coagulase positiva.

3.2.4.4 *Salmonella*

Após pré-enriquecimento a 37°C, por 24 horas, transferiu-se 1mL e depois 0,2mL da cultura obtida no pré-enriquecimento, para caldo seletivo Rapaport, e incubou-se a 44,5°C, por 24 horas.

Do enriquecimento seletivo efetuou-se plaqueamento seletivo, através de semeadura em superfície por estriamento descontínuo, com auxílio da alça de platina, nos seguintes meios solidificados: Ágar *Salmonella-Shigella* (SS) e Ágar Verde Brilhante (BGA).

Caso houvesse colônias típicas, transcorrido o período de incubação (37°C por 24 horas) do plaqueamento seletivo, tornar-se-ia necessário realizar provas bioquímicas através do Kit API, para confirmação da presença de *Salmonella* em 25mL do produto.

3.2.5 Análise de Imunoglobulina A (IgA)

Foram analisadas amostras de leite humano nas formas *in natura*, *in natura* suplementado, pasteurizado, pasteurizado suplementado.

As amostras (1mL) foram centrifugadas (7.000rpm) a 4°C, durante 60 minutos, para descarte da fração de gordura. A solução restante foi utilizada para determinação de IgA total.

O total de IgA do leite humano foi determinado por imunodifusão radial, que forma um imunocomplexo com um anticorpo específico no gel-agarosa das placas de

NOR-Partigen[®] (laboratório Behring). Este complexo aparece, após 48 horas, como um precipitado de forma circular (imunodifusão radial). O diâmetro destes anéis de precipitação é diretamente proporcional à concentração da proteína correspondente na amostra. O cálculo da concentração de imunoglobulina realiza-se utilizando uma tabela de referência, fornecida pelo fabricante.

3.2.6 Análise da Atividade de Água

O parâmetro que mede a disponibilidade de água em um alimento denomina-se "atividade de água" (A_w), sendo considerado um fator intrínscico da capacidade de sobrevivência ou multiplicação dos microrganismos presentes em um alimento (FRANCO, 2000). Define-se atividade de água de um alimento ou de uma solução qualquer como sendo a relação existente entre a pressão parcial de vapor da água contida na solução ou no alimento (P) e a pressão parcial de vapor da água pura (P_o), sob uma dada temperatura: $A_w = P/P_o$ (FRANCO, 2000).

Foram preparadas 05 amostras de 10g do suplemento, em diferentes datas, com intervalo entre 0 a 50 dias. As análises foram determinadas através do aparelho Aqualab CX-2 (marca BRASEQ).

3.2.7 Estatística das Análises dos Macro e Micronutrientes

Foi assessorada pelo Laboratório de Estatística II da Universidade Federal do Paraná, sendo utilizados instrumentos de estatística descritiva, delineamento completamente casualizado, análise de variância, teste de Bartlett's para Homocedasticidade, teste Lillifors para Normalidade, teste de comparações múltiplas, teste de Tukey, teste de Hartley, teste de Kruskal-Wallis e coeficiente de variação. Todos os cálculos tomaram como base os programas de análise estatística "Statgraphics Plus 2.1" e "Statistica 6.0". As descrições das metodologias encontram-se em anexo (apêndice 1).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ACOMPANHAMENTO DAS ATIVIDADES DE PRODUÇÃO DE LEITE EM BANCO DE LEITE

“Banco de Leite Humano é um centro especializado, responsável pela promoção e incentivo ao aleitamento materno e pela execução de atividades de coleta, processamento e controle de qualidade de colostro, leite de transição e leite humano maduro, para posterior distribuição, sob prescrição de médicos e nutricionistas” (BRASIL, 1998d).

Os dois centros observados seguem as rotinas descritas nas Recomendações Técnicas para Funcionamento de Bancos de Leite Humano (BRASIL, 1998c), estando de acordo com a Portaria nº322, de 26 de maio de 1998.

4.1.1 Seleção de Doadoras

Não foi observada em nenhum dos Bancos de Leite uma rotina de seleção de doadoras. Segundo a Portaria nº 322 (BRASIL, 1998a), doadoras são nutrizes sadias que apresentam secreção láctica superior às exigências de seu filho, e que se dispõem a doar o excedente, por livre e espontânea vontade.

Na prática, as doadoras são aquelas mães que espontaneamente entram em contato com o Banco de Leite e oferecem seu leite excedente. Muitas mães, quando ainda internadas na rede hospitalar, são incentivadas à doação de leite. Outras, já em sua residência, tornam-se também doadoras, ao observar que o seu volume de leite está acima da demanda do filho. Mães que receberam assistência dos técnicos do Banco de Leite, em razão de dificuldades na amamentação, comumente tornam-se também doadoras, após sanadas suas dificuldades.

A admissão dessas mães como doadoras é muito simples. Muitas vezes são orientadas por via telefônica quanto à ordenha correta. Semanalmente, recebem a

visita de um técnico encarregado de entregar-lhes frascos esterilizados, para coleta, e receber o leite coletado.

Dados sobre avaliação da saúde da doadora e do seu filho, assim como dos aspectos microbiológicos de seu leite, não foram encontrados na rotina dos Bancos de Leite estudados.

Levando-se em conta que o leite humano pode ser um veículo de microrganismos patogênicos transmissores de doenças infecto-contagiosas, como AIDS, citomegalovírus, hepatite B, lesões herpéticas no mamilo, entre outras, a qualidade microbiológica do leite, e principalmente a saúde da mãe, deveriam ser avaliadas (BRASIL, 1998c).

4.1.2 Coleta

A coleta do leite pode realizar-se por expressão manual ou com auxílio de bombas, manuais ou elétricas, em salas ou recintos apropriados (localizados nos Bancos de Leite), em enfermarias, nos postos de coleta ou nas residências (BRASIL, 1998c).

Existem controvérsias sobre a influência do método de extração sobre a qualidade nutricional do leite humano. Segundo HUERTA et al. (1995), a bomba elétrica é o instrumento mais recomendado, beneficiando o volume e a concentração de lipídios.

Nos Bancos de Leite estudados, as mães são orientadas para a extração manual, quando a coleta é efetuada na residência. Este método, além de menos doloroso, implica massagem das mamas, o que acaba por melhorar a lactação e diminuir o desconforto de mamas muito cheias.

Quando a coleta é realizada nos Bancos de Leite, utiliza-se a bomba manual, que oferece conforto e eficiência. Nestes casos, os funcionários dos Bancos de Leite seguem todos os cuidados higiênico-sanitários descritos nas rotinas técnicas (BRASIL, 1998c). Para a conservação do leite, são utilizados vidros com tampas de plástico, previamente esterilizados.

4.1.3 Armazenamento e Transporte

As doses de leite armazenadas nos vidros são mantidas em congelador ou freezer, na casa das doadoras, onde são recolhidas semanalmente.

Nos equipamentos residenciais podem existir falhas, comprometendo a qualidade do produto. Não se observou uma rotina de avaliação desses equipamentos por parte da equipe técnica dos Bancos de Leite.

Os vidros com leite são transportados em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável, prática esta que se mostrou eficiente para a conservação do leite congelado.

4.1.4 Processamento e controle de qualidade

O produto cru, congelado, que chega ao Banco de Leite, normalmente é estocado em freezer, para posterior processamento.

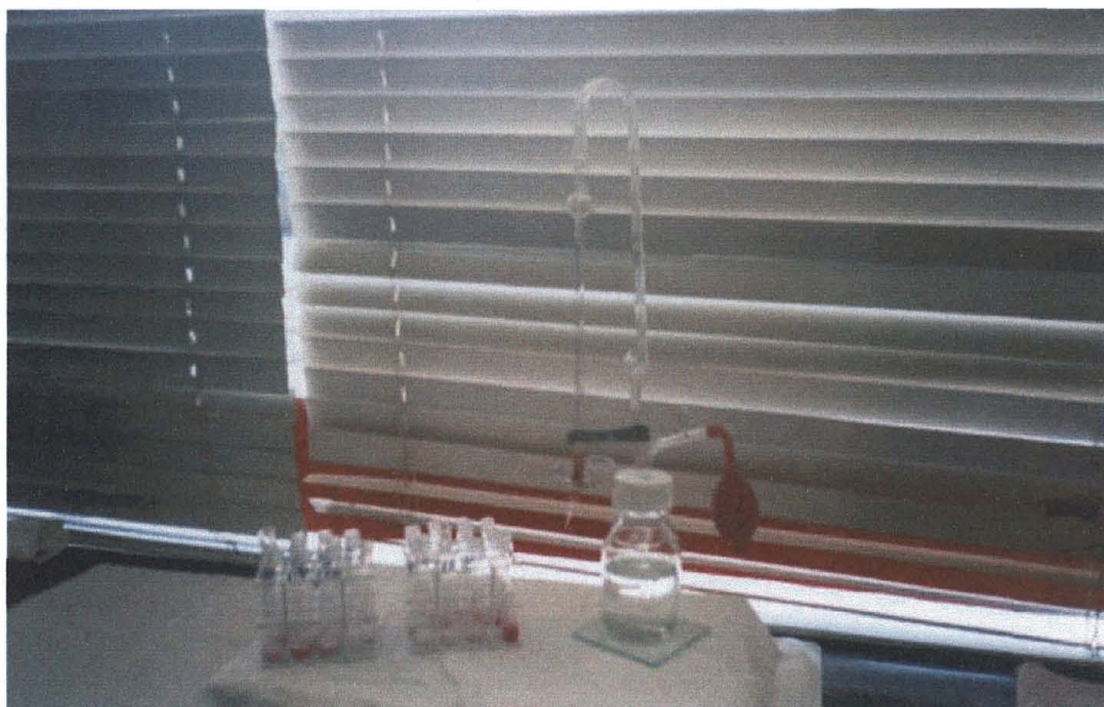
A seguir, o leite é descongelado e reenvasado em campo de chama, em frascos esterilizados próprios para a pasteurização, conforme recomendam as Rotinas Técnicas (BRASIL, 1998c). O descongelamento é realizado em banho-maria (45°C) ou sob água corrente.

Uma amostra do produto é utilizada para a realização do teste de acidez-Dornic. A determinação da acidez em graus Dornic é usada como rotina de controle de qualidade em laticínios (Figura 1).

Para uma avaliação objetiva da qualidade geral do leite humano, foi proposto o uso da técnica tradicional (INSTITUTO ADOLFO LUTZ), usando-se uma amostragem volumetricamente menor que a empregada na rotina de laticínios.

Na rotina dos Bancos de Leite estudados, o valor de 7,0 graus Dornic é determinado como limite máximo aceitável.

FIGURA 1 – APARELHO PARA ANÁLISE DE ACIDEZ ENCONTRADO NO BANCO DE LEITE DO HOSPITAL DA CRIANÇA DE PONTA GROSSA



Paralelamente a esta análise, é realizada a pasteurização a 62,5°C por 30 minutos e o resfriamento em água, a mais ou menos 5°C. No Banco de Leite do Hospital de Clínicas da UFPR funciona um resfriador acoplado ao pasteurizador (Figura 2).

Sabe-se que a pasteurização é o método eficiente na destruição de microrganismos termolábeis, garantindo a destruição total do vírus HIV (BRASIL, 1998c).

O produto passa ainda pelo controle físico-químico, através da técnica do crematócrito (LUCAS et al., 1978).

FIGURA 2 – PASTEURIZADOR DE LEITE ENCONTRADO NO HOSPITAL DA CRIANÇA DE PONTA GROSSA



Para o controle sanitário, são pesquisados coliformes totais, inoculando-se 4 alíquotas de 1mL em tubos de 10mL de caldo verde brilhante a 5%, com tubos de Durhan em seu interior. Quando da presença de gás no interior dos tubos inoculados (36°C / 48h), estes são repicados para a pesquisa de *Escherichia coli* (Figura 3).

FIGURA 3 – PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS PARA CONTROLE DE QUALIDADE DO LEITE HUMANO PROCESSADO EM BANCO DE LEITE



O leite permanece estocado em freezer específico e é distribuído apenas após a liberação do respectivo teste microbiológico (Figura 4).

Atualmente, os tipos de leite são assim classificados: colostro (até 7 dias após o parto); leite de transição (7 – 15 dias) e leite maduro (a partir do 15º dia pós-parto), observando-se também sua concentração de gordura.

Após descongelado, o leite deve ser utilizado na sua totalidade (não deve ser novamente congelado) ou descartado.

Quando o lactente finalmente recebe o leite, o produto passou, portanto, por um congelamento, um descongelamento, pasteurização, novo congelamento, outro descongelamento e um aquecimento.

FIGURA 4 - LEITE HUMANO PASTEURIZADO, ARMAZENADO E REFRIGERADO LIBERADO PARA DISTRIBUIÇÃO



O controle de cada uma dessas etapas é importante para garantir a conservação das qualidades sanitárias e nutricionais do leite humano.

BJORKTEN (1980) estudou o efeito do processamento térmico do congelamento e do descongelamento sobre os componentes protetores do leite humano, detectando perdas consideráveis destes elementos durante a pasteurização, bem como perdas pouco significantes durante o congelamento e descongelamento.

Concluiu-se, através deste acompanhamento, ser operacionalmente viável a produção de um suplemento e sua manipulação na rotina dos Bancos de Leite.

4.2 ANÁLISES DOS MACRONUTRIENTES

4.2.1 Estatísticas Descritivas

A análise a seguir teve por objetivo verificar o comportamento dos dados da amostra. Apresenta um resumo das principais estatísticas, como, por exemplo, a mediana, a amplitude, os quartis e a distribuição da qual provêm os dados em estudo. Verificou-se, também, nesta análise, pontos discrepantes (*outliers*), que podem ser observados na Figura 5. Os resultados das análises descritivas estão apresentados nas Tabelas 8, 9, 10, 11.

O leite maduro apresentou maior concentração de lactose (VALDÉS, 1996), podendo-se observar, porém, um *outlier*, o que significa que a respectiva lactante proporcionou baixa concentração de lactose, em relação às demais. Constatou-se forte assimetria negativa nas análises do leite colostro, o que indica que grande parte das análises ficou abaixo da média ou mediana. Já o leite de RNPT apresentou maior variabilidade deste nutriente, em relação aos demais.

TABELA 8 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL LACTOSE (g%)

Grupos	N	Média	Mediana	Total	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	Variância	D. Padrão
Maduro	26	8,60	8,63	223,5	6,11	10,18	8,15	9,22	0,8656	0,9304
Colostro	10	7,05	7,18	70,52	4,93	8,04	6,65	7,82	0,8510	0,9225
RNPT	10	6,56	6,81	65,59	3,86	9,00	5,79	7,18	1,9840	1,4086

Com relação à proteína, nota-se que o leite colostro e RNPT apresentaram em média a mesma concentração, com leve prevalência no primeiro. Ambos mostraram concentração de nutrientes maior que a do leite maduro (GROSS et al., 1980; ANDERSON et al., 1981; POLBERGER et al., 1989; DAWODU et al., 1990; SCHANLER, 1995). Observa-se também forte assimetria positiva no leite maduro e RNPT, indicando que muitas das lactantes apresentaram concentração de nutrientes acima da média.

TABELA 9 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL PROTEÍNAS (g%)

Grupos	N	Média	Mediana	Total	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	Variância	D. Padrão
Maduro	26	1,07	1,03	27,82	0,73	1,54	0,87	1,17	0,0502	0,2240
Colostro	10	1,71	1,75	17,14	1,28	2,13	1,44	1,95	0,0854	0,2922
RNPT	10	1,72	1,55	17,21	1,33	2,48	1,39	1,88	0,1647	0,4059

Com relação a lipídios, verificou-se que o leite maduro, colostro e RNPT apresentaram em média a mesma concentração. Pode-se observar forte assimetria negativa no leite colostro.

TABELA 10 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL LIPÍDIOS (g%)

Grupos	N	Média	Mediana	Total	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	Variância	D. Padrão
Maduro	26	2,56	2,29	66,48	1,07	4,40	2,03	3,17	0,6355	0,7972
Colostro	10	2,48	2,40	24,76	1,03	4,00	1,80	3,33	0,8208	0,9060
RNPT	10	2,48	2,69	24,81	1,00	3,37	2,00	3,20	0,5725	0,7567

As concentrações médias de lipídios diferem das encontradas em estudos que indicam serem maiores no leite de RNPT do que em leite de RN (SIMONEN et al., 1984; LAWRENCE, 1994).

Os coeficientes de variação da lactose, proteína e lipídio foram, respectivamente: 21,83%; 20,8% e 32,35%. Torna-se possível, portanto, perceber uma variação maior de lipídios entre uma doadora e outra (JENSEN, 1996; ALMEIDA, 1999).

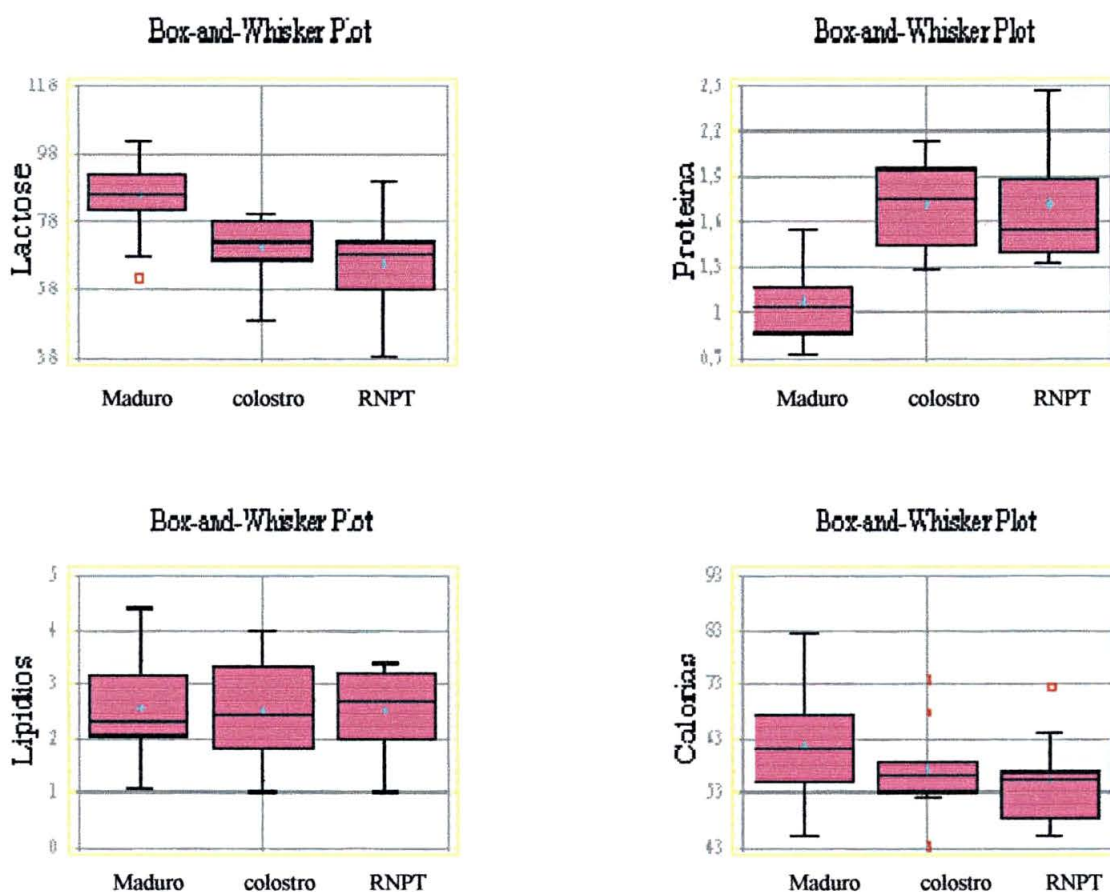
No que concerne a calorias, verificou-se que o leite maduro apresenta

concentração acima dos demais, percebendo-se também três *outliers* no colostro, o que indica que uma lactante apresentou leite com baixa concentração de calorias, em comparação à alta concentração em outras duas. Uma lactante apresentou concentração de calorias (*outliers*) acima das demais, no leite RNPT.

TABELA 11 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL CALORIAS (g%)

Grupos	N	Média	Mediana	Total	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	Variância	D. Padrão
Maduro	26	61,67	61,05	1603,39	45,46	82,45	55,06	67,09	79,5015	8,9164
Colostro	10	57,36	56,19	573,57	43,15	73,77	53,24	58,85	70,0613	8,3703
RNPT	10	55,44	55,38	554,44	45,31	72,25	48,53	56,99	63,9891	7,9993

FIGURA 5 – BOX-PLOT DOS NUTRIENTES DO LEITE HUMANO



4.2.2 Análise de Variância

Os resultados da análise de variância considerando-se todas as variáveis em estudo estão apresentadas nas Tabelas 12, 13, 14 e 15.

TABELA 12 - ANOVA DE LACTOSE

F. V.	G.L.	S.Q	Q. M.	F ₀	p-Valor
Tratamentos	2	37,4620	18,7310	17,08	0
Resíduos	43	47,1549	1,0966		
Total	45	84,6168			

LEGENDA: G.L.= Grau de Liberdade; S.Q.= Soma dos Quadrados; Q.M.= Quadrados médios

Baseado na regra de decisão do teste de hipóteses, rejeitou-se H₀ e decidiu-se em favor de H₁ com $\alpha = 0,05$. Pode-se então afirmar que existem diferenças significativas entre os leites.

TABELA 13 - ANOVA DE PROTEÍNA

F. V.	G.L.	S.Q	Q. M.	F ₀	p-Valor
Tratamentos	2	4,7397	2,3698	29,07	0
Resíduos	43	3,5053	0,0815		
Total	45	8,2450			

LEGENDA: G.L.= Grau de Liberdade; S.Q.= Soma dos Quadrados; Q.M.= Quadrados médios

Baseado na regra de decisão do teste de hipóteses, rejeitou-se H₀ e decidiu-se em favor de H₁ com $\alpha = 0,05$. Existem, portanto, diferenças significativas entre os leites.

TABELA 14 - ANOVA DE LIPÍDIOS

Fontes de Variação	G.L.	S.Q.	Q. M.	F ₀	p-Valor
Tratamentos	2	0,0697	0,0348	0,05	0,9488
Resíduos	43	28,4287	0,6611		
Total	45	28,4983			

LEGENDA: G.L.= Grau de Liberdade; S.Q.= Soma dos Quadrados; Q.M.= Quadrados médios

Tomando-se por base a regra de decisão do teste de hipóteses, não foi rejeitado H₀ com $\alpha = 0,05$, o que vale afirmar não existirem diferenças significativas entre os leites.

TABELA 15 - ANOVA DE CALORIAS

F. V.	G.L.	S.Q	Q. M.	F ₀	p-Valor
Tratamentos	2	332,06	166,0280	2,24	0,1193
Resíduos	43	3193,99	74,2789		
Total	45	3526,05			

LEGENDA: G.L.= Grau de Liberdade; S.Q.= Soma dos Quadrados; Q.M.= Quadrados médios

Com base na regra de decisão do teste de hipóteses, não foi rejeitado H_0 com $\alpha = 0,05$. Pode-se afirmar não existirem diferenças significativas entre os tratamentos.

Confirmando os resultados da estatística descritiva, estes dados vêm ao encontro de estudos que demonstram variação entre os leites de mães de RN, RNPT e colostro, sobretudo de proteínas. O item lipídios, e mesmo calorías, difere destes mesmos estudos, não ocorrendo variação significativa entre os tratamentos, mas somente entre doadoras.

4.2.3 Teste de Comparações Múltiplas (Tukey)

Neste teste, que visa detectar diferenças mínimas significativas entre os tratamentos, os resultados estão apresentados nas Tabelas 16 e 17, onde se avaliaram os itens lactose e proteínas, cujas diferenças foram consideradas significativas.

TABELA 16 - TESTE DE TUKEY PARA LACTOSE.

Tratamentos	N	Médias	Grupos Homogêneos
1: Leite Maduro	26	8,5962	X
2: Leite Colostro	10	7,0520	X
3: Leite RNPT	10	6,5590	X
Contrastes de Médias			Diferenças ± Limite
1 - 2			* 1,5442 0,9460
1 - 3			* 2,0372 0,9460
2 - 3			0,4930 1,1370

(*) Diferenças mínimas significativas nas médias dos tratamentos.

Em face das diferenças significativas entre os tratamentos, este teste apresenta os contrastes de médias dos mesmos.

TABELA 17 - TESTE DE TUKEY PARA PROTEÍNAS.

Tratamentos	N	Médias	Grupos Homogêneos
1: Leite Maduro	26	1,0700	X
2: Leite Colostro	10	1,7140	X
3: Leite RNPT	10	1,7210	X
Contrastes de Médias			Diferenças ± Limite
1 - 2			* - 0,6440 0,2579
1 - 3			* - 0,6510 0,2573
2 - 3			- 0,0070 03099

(*) Diferenças mínimas significativas nas médias dos tratamentos.

Em face das diferenças significativas entre os tratamentos, este teste

apresenta os contrastes de médias entre os mesmos.

4.2.4 Verificação das Pressuposições da ANOVA

Através da análise gráfica e dos testes de Bartlett's e Lilliefors apresentados nos apêndices 2 e 3, pode-se afirmar que não houve violação dos pressupostos básicos da ANOVA, sendo, portanto, utilizada como instrumento estatístico nestas análises.

4.3 ANÁLISES DOS MICRONUTRIENTES

4.3.1 Estatísticas Descritivas

A Figura 6 apresenta o comportamento dos dados das amostras, como a mediana, a amplitude, os quartis e os pontos discrepantes (*outliers*).

Quanto ao item cálcio, os três tratamentos apresentaram uma assimetria positiva, ou seja, houve maior variação entre os valores da concentração de cálcio, superiores à mediana, variação, aliás, bem mais acentuada para o leite maduro, devido ao valor discrepante (*outlier*). Em média, o leite colostro apresentou maior concentração de cálcio, enquanto o leite maduro obteve o menor valor para esta estatística. Deve-se notar, porém, que o valor discrepante observado no leite maduro influencia diretamente, incrementando a média e a variância.

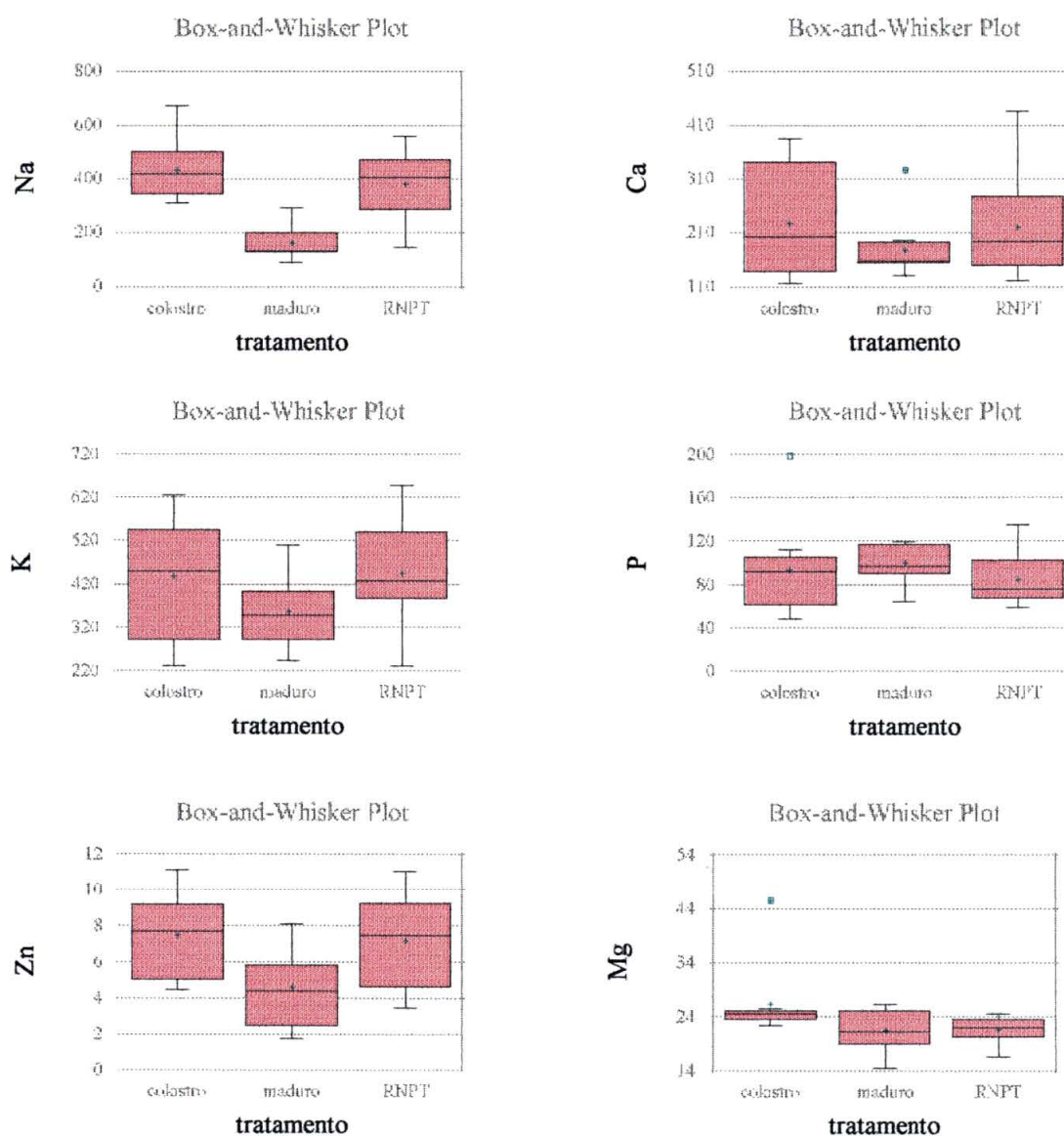
Verificou-se, no item magnésio, para o leite maduro e RNPT, uma proximidade entre os valores de média e mediana. Quanto ao leite colostro, ocorre forte assimetria positiva, em virtude de um valor discrepante existente, o qual acarreta, também, um incremento da média e variância deste tratamento. Mesmo que o valor discrepante fosse excluído, ainda assim o leite colostro apresentaria maior média de concentração do nutriente.

No item potássio, observou-se, quanto à assimetria, um comportamento diferente para cada tratamento: enquanto o leite RNPT apresentou certo equilíbrio, o colostro mostrou assimetria negativa e o leite maduro obteve o menor valor para esta

estatística.

Quanto ao sódio, verificou-se assimetria negativa para o leite RNPT e assimetria positiva para os leites colostro e maduro. Em média, o leite colostro apresentou maior concentração de sódio, enquanto o leite maduro obteve o menor valor.

FIGURA 6 - BOX-PLOT DOS MINERAIS DO LEITE HUMANO.



No item zinco, não houve indícios de assimetria acentuada para nenhum dos tratamentos. Em média, o leite colostro apresentou maior concentração de zinco, ficando o menor valor com o leite maduro.

No que concerne ao fósforo, enquanto o leite maduro apresentou leve assimetria negativa, o colostro e leite RNPT mostraram assimetria positiva. Em média, constatou-se maior concentração de fósforo no leite maduro, sendo o menor valor obtido pelo RNPT. Deve-se notar, porém, que o valor discrepante observado no leite colostro influenciou diretamente a média e a variância, acarretando o incremento de ambos.

As Tabelas 18 a 23 apresentam a média e a variância de cada variável em relação ao tipo de leite. Pode-se observar que, em média de concentração, os leites maduro e RNPT apresentaram, respectivamente, valores superiores para fósforo e potássio, enquanto que o leite colostro apresentou valores superiores para as demais variáveis, ou seja, cálcio, sódio, zinco e magnésio (WORTHINGTON-ROBERTS, 1993).

TABELA 18 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL CÁLCIO (mg/L)

GRUPOS	N	Média	Mediana	Total	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	Variância	Desvio Padrão
Maduro	10	178,79	159,17	1787,86	130,29	327,03	154,45	192,45	3090,60	55,59
Colostro	10	227,52	202,34	2275,22	115,55	385,66	138,74	340,74	10488,40	102,41
RNPT	10	220,03	194,83	2200,32	120,38	436,06	149,95	278,08	8828,89	93,96

TABELA 19 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL MAGNÉSIO (mg/L)

GRUPOS	N	Média	Mediana	Total	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	Variância	Desvio Padrão
Maduro	10	21,49	21,34	214,78	14,49	26,36	18,98	25,17	15,5682	3,9457
Colostro	10	26,37	24,52	263,69	22,47	45,39	23,58	25,20	45,5337	6,7478
RNPT	10	21,56	22,12	215,63	16,56	24,52	20,30	23,53	6,6741	2,5834

TABELA 20 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL POTÁSSIO (mg/L)

GRUPOS	N	Média	Mediana	Total	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	Variância	Desvio Padrão
Maduro	10	355,24	348,23	3552,40	241,98	511,10	291,70	403,24	5702,12	75,5124
Colostro	10	437,49	449,86	4374,89	229,49	625,56	290,74	544,53	20496,70	143,167
RNPT	10	443,67	426,78	4436,70	229,44	648,09	386,46	541,11	16453,00	128,269

TABELA 21 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL SÓDIO (mg/L)

GRUPOS	n	Média	Mediana	Total	Mínimo	Máximo	1° Quartil	3° Quartil	Variância	Desvio Padrão
Maduro	10	162,72	133,54	1627,23	90,64	291,92	129,66	202,67	3504,95	59,202
Colostro	10	433,61	419,07	4336,08	307,65	673,60	345,83	500,20	12856,50	113,38
RNPT	10	379,72	406,75	3797,24	145,96	560,95	285,02	471,91	17791,70	133,38

TABELA 22 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL ZINCO (mg/L)

GRUPOS	n	Média	Mediana	Total	Mínimo	Máximo	1° Quartil	3° Quartil	Variância	Desvio Padrão
Maduro	10	4,56	4,41	45,64	1,75	8,08	2,48	5,81	5,1326	2,2655
Colostro	10	7,46	7,70	74,58	4,45	11,15	5,00	9,16	6,4362	2,5370
RNPT	10	7,16	7,45	71,59	3,44	11,02	4,65	9,22	6,8242	2,6123

TABELA 23 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA A VARIÁVEL FÓSFORO (mg/L)

GRUPOS	N	Média	Mediana	Total	Mínimo	Máximo	1° Quartil	3° Quartil	Variância	Desvio Padrão
Maduro	10	99,75	96,40	997,46	64,23	119,52	90,52	117,48	293,656	17,1364
Colostro	10	93,12	92,18	931,16	47,78	198,80	61,06	105,61	1850,62	43,0188
RNPT	10	84,69	75,50	846,88	58,80	134,99	67,32	102,14	587,83	24,2452

Deve-se ter claro que esta análise diz respeito às estimativas pontuais de médias e variâncias, podendo, portanto, ser significativas, ou não, as diferenças observadas. A análise de significância destas diferenças constituirá o objeto seguinte deste estudo.

4.3.2. Análise de Variância (ANOVA)

As variáveis cujos pressupostos foram verificados e que, portanto, são passíveis da Análise de Variância, são Na e K. Seguem abaixo os resultados da ANOVA para estas variáveis:

TABELA 24 - ANOVA SÓDIO

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F ₀	P-Valor
Tratamentos	2	411239,0	205619,0	18,06	0
Resíduos	27	307379,0	11384,4		
Total	29	718618,0			

LEGENDA: G.L.= Grau de Liberdade; S.Q.= Soma dos Quadrados; Q.M.= Quadrados médios

Tendo-se como base a Regra de Decisão do teste de hipóteses, rejeitou-se H_0 e decidiu-se a favor de H_1 com $\alpha = 0,05$. Pode-se, portanto, afirmar que existem

diferenças significativas entre os tratamentos.

TABELA 25 - ANOVA POTÁSSIO

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F ₀	P-Valor
Tratamentos	2	48743,2	24371,6	1,71	0,1991
Resíduos	27	383867,0	14217,3		
Total	29	432610,2			

LEGENDA: G.L.= Grau de Liberdade; S.Q.= Soma dos Quadrados; Q.M.= Quadrados médios

Com base na mesma regra do item anterior, não foi rejeitado H_0 com $\alpha = 0,05$. Pode-se, então, afirmar que não existem diferenças significativas entre os tratamentos.

4.3.3 Teste de Comparações Múltiplas (Tukey)

Como a análise de concentração de Na revelou diferença significativa na Tabela de ANOVA, apresenta-se abaixo a Tabela 26 com o resultado para o teste de Tukey, que indica entre quais pares de tratamentos ocorreu esta diferença.

Verifica-se que os leites colostro e RNPT não diferem significativamente entre si, mas diferem, ambos, do leite maduro. Em suma: o valor de concentração de Na para o leite maduro é inferior e significativamente diferente dos demais tratamentos, com um nível α de 5% de confiança.

TABELA 26 - TESTE DE TUKEY (95%) PARA SÓDIO

Tratamentos	N	Médias	Grupos Homogêneos
1: Leite Maduro	10	162,723	X
2: Leite Colostro	10	433,608	X
3: Leite RNPT	10	379,724	X
Contrastes de Média		Diferenças	+/- Limite
1 - 2		*-270.885	118,342
1 - 3		*-217.001	118,342
2 - 3		53.884	118,342

Obs: (*) denota diferença estatisticamente significativa

4.3.4 Verificação dos Pressupostos da ANOVA

Através de análise gráfica, são apresentados os pressupostos de

independência, homocedasticidade e normalidade. No caso da homocedasticidade e normalidade, acrescentam-se os resultados, respectivamente, dos testes de Hartley e Lilliefors, todos apresentados em anexo (apêndices 4 e 5).

4.3.5 Teste de Kruskal-Wallis

Aplicado para as variáveis Ca, Mg, Zn e P, que não apresentaram condições suficientes para se submeterem à análise de variância paramétrica.

As Tabelas com os dados e seus respectivos postos utilizados no cálculo da estatística de teste constam em anexo (apêndice 6).

A Tabela 27 apresenta os dados conclusivos do teste.

TABELA 27 - RESULTADO DO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS

	H calculado	Probabilidade	Conclusão
Ca	0,805806	$0,95 < p < 0,98$	Não rejeita
Mg	7,049677	$0,05 < p < 0,02$	Rejeita
Zn	6,760645	$0,05 < p < 0,02$	Rejeita
P	2,68129	$0,30 < p < 0,20$	Não rejeita

Para as variáveis P e Ca não foi rejeitada a hipótese nula, ou seja, não se constata diferença significativa entre os tipos de leite, quanto à concentração destes minerais. Para as variáveis Mg e Zn houve, porém, a rejeição da hipótese de igualdade.

4.3.6 Teste de Comparações Múltiplas (d.m.s.)

Como as análises de concentração de Mg e Zn apresentaram diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis, segue-se a Tabela 28 com o resultado para o teste de d.m.s., que indica entre quais pares de tratamentos ocorreu a diferença:

TABELA 28 - RESULTADO DO TESTE DE COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS (D.M.S.)

	Mg	Zn	d.m.s – 5%
Colostro – Maduro	80,5	91,5	29,17
Colostro – RNPT	98	6	29,17
Maduro – RNPT	17,5	85,5	29,17

De acordo com o valor calculado de d.m.s. com 5% de confiança, constata-se

diferença significativa para todos os contrastes envolvendo Mg (exceto maduro e RNPT) e para todos envolvendo Zn (exceto colostro e RNPT). Logo, o leite colostro apresenta para magnésio média superior e significativamente diferente das demais, enquanto que para zinco o leite maduro apresenta média inferior e significativamente diferente das demais.

4.3.7 Coeficiente de Variação

Os coeficientes de variação do cálcio, magnésio, potássio, sódio, zinco e fósforo são apresentados na Tabela 29. Torna-se possível, portanto, perceber uma variação maior de cálcio e zinco entre uma doadora e outra.

TABELA 29 – COEFICIENTES DE VARIAÇÃO PARA MINERAIS						
Minerais	Ca	Mg	K	Na	Zn	P
Variação (%)	39,57	18,64	27,63	32,55	40,05	30,6

4.4 ADEQUAÇÃO DOS MACRONUTRIENTES

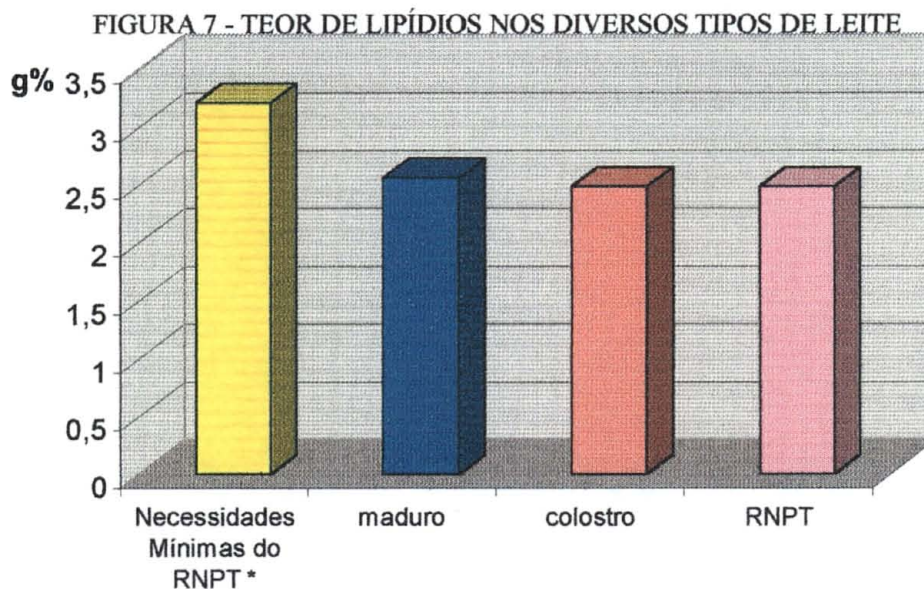
O leite processado em Banco de Leite é proveniente de doadoras com diferente idade cronológica, gestacional, de lactação, assim como em diferentes fases de lactação.

Estas situações podem alterar a composição do leite humano, influenciando a qualidade final ofertada ao RNBP.

Conforme demonstrou o estudo estatístico, proteínas e calorias do leite processado em Banco de Leite apresentaram variação mais acentuada para proteínas (ATKINSON et al., 1978; 1983; GROSS et al., 1980; ANDERSON et al., 1981, 1983; BUTTE et al., 1984; PIERSE et al., 1988; JAIN e BIJLANI, 1989; VALDÉS, 1996; MENA, 1998; LAWRENCE, 1994; MATALOUN e LEONE, 2000).

No item lipídios, pode-se observar que o leite maduro apresentou concentração levemente maior, se comparado aos outros dois tipos de leite (Figura 7). Esta variação assemelha-se a resultados de trabalhos que também concluíram serem os

valores do leite termo mais elevados em gordura, se comparados aos do pré-termo (GROSS et al., 1980; PAUL et al., 1997). Outros estudos encontraram valores mais elevados de lipídios no leite de RNPT, nos primeiros dias de lactação (PEREIRA e BARBOSA, 1986; SCHANLER, 1998; VALDÉS, 1996).



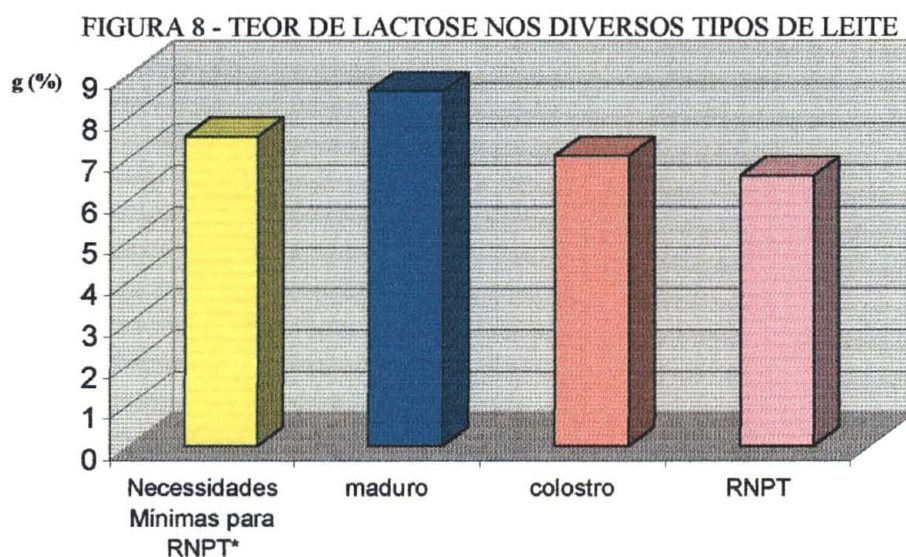
* FONTE: American Academy of Pediatrics (AAP – 1985)

Em nenhum dos casos, porém, a concentração de leite atingiu concentração média de 3g% de lipídios (BRASIL, 1998c; ESPGAN, 1987; WORTHINGTON, 1993).

Apesar dos diferentes tratamentos não apresentarem variação significativa, ela se fez representativa entre as doadoras, no mesmo tipo de leite. Tome-se como exemplo o leite maduro, cujos menores valores chegaram a 1,76 g% e os maiores a 3,36 g% de proteína. É uma variação justificável pelas características individuais de cada doadora, pelas diferentes idades de lactação e pelo período da mamada em que foi coletado o leite (SCHANLER, 1995; FRIEL, 1999). Sabe-se, por exemplo, que o conteúdo de lipídios varia do leite de uma mulher para outra (FERRIS, et al, 1988; COELHO, 1988; BRASIL, 1988) e que o final da mamada é mais rico em lipídios (HAMOSH, 1985; BRASIL, 1988; JENSEN, 1996; ALMEIDA, 1999).

No caso específico de RNBP, a recomendação média (ESPGAN, 1987; NCCPS, 1995) de pelo menos 4 g/kg/peso dificilmente seria alcançada. Por exemplo: um lactente pesando 1,5kg, ingerindo 180mL de leite (segundo as recomendações da AAP (1985) de 120 mL/kg/peso), estaria recebendo do leite do Banco de Leite uma média de 4,6g de (2,56g/100mL), quando deveria estar recebendo 6g/dia.

Quanto ao item lactose, o leite de mães de RNPT apresentou concentração mais baixa, em comparação aos outros tratamentos (Figura 8). Este resultado coincide com os de alguns estudos que comprovam existir no leite de mulher com parto prematuro uma concentração mais baixa de lactose em relação ao leite maduro (COPA, 1991; VALDÉS, 1996). Em todos os tratamentos, a concentração de lactose foi superior à encontrada em outros estudos (PEREIRA e BARBOSA, 1986; WORTHINGTON, 1993; EUCLYDES, 1997; SCHANLER, 1998; BRASIL, 1998c). Os valores médios do Ministério da Saúde são de 7,0-7,5% de lactose, enquanto este estudo apresentou valores médios de 8,6%.



* FONTE: Nutrition Comitee, Canadian Paediatric Society – Nutrient Needs and Feeding of Premature Infants - 1995

No item proteína, o leite colostro e o de mães de RNPT apresentaram valores significativamente superiores, em relação ao leite maduro (Figura 9). Estudos

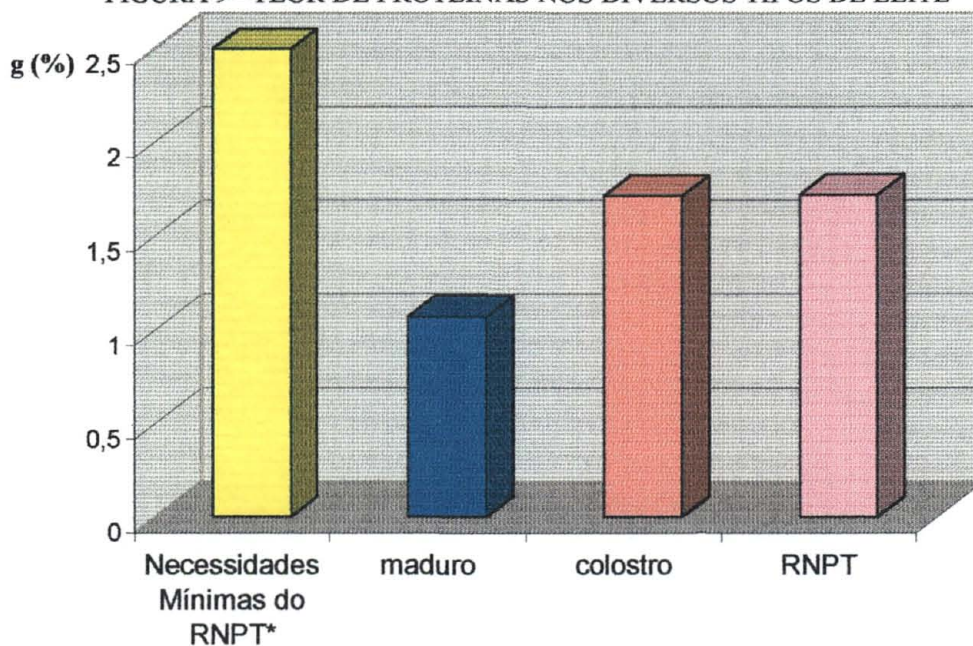
anteriores também demonstram ser o leite de mães de RNPT mais rico em proteína (GROSS et al., 1980; SCHANLER e OH, 1980; ANDERSON et al., 1981; GUERRINI et al., 1981; LEMONS et al., 1982; ATKINSON et al., 1983; BUTTE et al., 1984; DARWISH et al., 1989; POLBERGER et al., 1989; DAWODU et al., 1990; SCHANLER, 1995; VALDÉS, 1996; MENA e MILAD, 1998).

Estes valores mais elevados de proteína ainda estão aquém das recomendações de 2,25–3,1g/ (ESPGAN, 1987). Se tomarmos como exemplo um lactente com peso de 1500g e consumo de 120mL/, ele estaria recebendo 2,16g de proteína, quando sua necessidade mínima seria de 3,37g.

Embora a concentração de proteínas diminua durante a lactação, as necessidades deste nutriente no RNPT não diminuem, até aproximadamente sua idade a termo (SCHANLER, 2001).

Se levarmos ainda em conta que a maior demanda de leite nos Bancos de Leite é de leite maduro, com composição média de proteína de 1g%, os valores oferecidos tornam-se ainda mais insuficientes.

FIGURA 9 - TEOR DE PROTEÍNAS NOS DIVERSOS TIPOS DE LEITE



* FONTE: Nutrition Comitee, Canadian Paediatric Society – Nutrient Needs and Feeding of Premature Infants - 1995

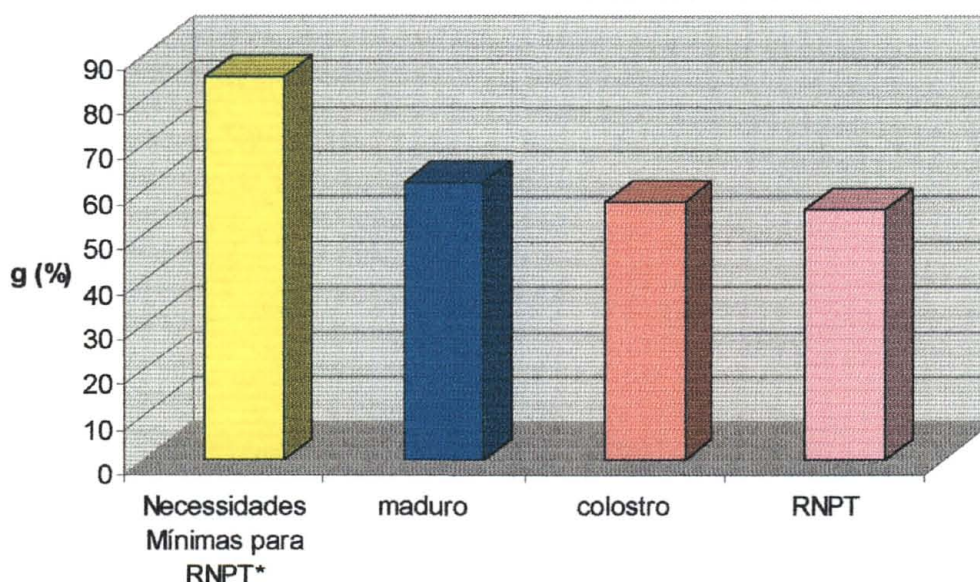
No que se refere ao item calorias, os valores também variam de mãe para mãe (FERRIS, 1988) e aumentam conforme seu amadurecimento (PAUL, 1997; GROSS, 1980).

Nenhum dos tipos de leite apresentou valores próximos às recomendações (Figura 10). Retomando o exemplo do lactente pesando 1500g, suas necessidades seriam de 180kcal/dia. No caso do leite maduro, tornar-se-ia necessário um consumo de 295mL/dia, quando a recomendação (AAC, 1985) não ultrapassa 180mL/dia (120 mL/kg).

Muito da variação do conteúdo de energia resulta das diferenças no conteúdo de gordura (2,5-4,4g/dL), que varia do início para o final da lactação, ao longo o dia, de mãe para mãe e conforme o tipo de ordenha (SCHANLER, 1995; SCHANLER, 2001; VALENTINE et al., 1994).

Os valores encontrados no colostro estão próximos dos apresentados por WORTHINGTON (1993), sendo de 57,9kcal para calorias, 2,29g% para proteínas e 2,38g% para lipídios, apresentando elevação apenas no item lactose.

FIGURA 10: TOTAL DE CALORIAS NOS DIVERSOS TIPOS DE LEITE



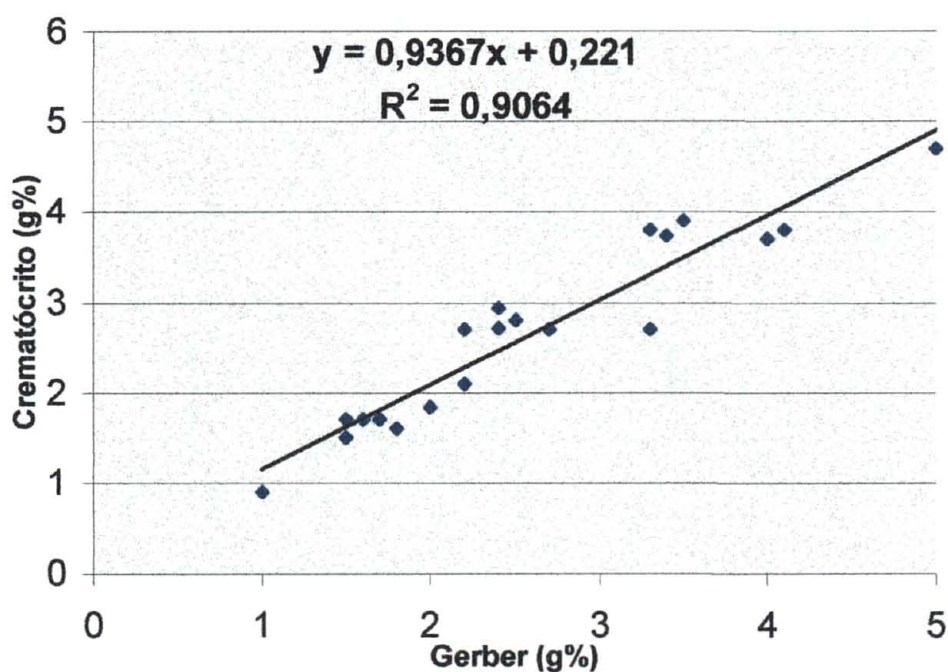
* FONTE: Nutrition Comitee, Canadian Paediatric Society – Nutrient Needs and Feeding of Premature Infants - 1995

Estes resultados indicam a necessidade de estudos que possam adaptar a composição do leite humano para o RNBP, como, por exemplo, o desenvolvimento de um suplemento, além da elaboração de práticas de processamento que visem minimizar essas flutuações.

4.5 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS BUTIRÔMETRO E CREMATÓCRITO PARA ANÁLISE DE GORDURA NO LEITE

O estudo revelou uma diferença média de 5,8% e coeficiente de correlação de 0,9668 entre os dois métodos. Esta correlação pode ser descrita pela equação: $y=0,9249x + 0,1622$, conforme se verifica na Figura 11. As diferenças entre os valores médios dos dois métodos não foram estatisticamente significantes ($p= 0,917$).

FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CORRELAÇÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS



Os resultados obtidos demonstram que o crematócrito, se comparado à técnica de Gerber, é um método eficiente. Pode ser utilizado como instrumento

classificatório de leite humano em Banco de Leite, pesquisas e investigações epidemiológicas. Trata-se de um método rápido, simples e de baixo custo. Utiliza-se, por exemplo, 1mL de amostra, aproximadamente, enquanto o de Gerber requer 33mL (ambos em triplicata); nenhum reagente é necessário, enquanto o de Gerber exige ácido sulfúrico e álcool isoamílico.

A Figura 12 apresenta capilares com diferentes tipos de leite.

FIGURA 12 - MÉTODO DO CREMATÓCRITO / DIFERENTES CAPILARES



Não obstante a indiscutível qualidade do leite humano, faz-se necessária a sua classificação, como, por exemplo, no tocante ao parâmetro do teor de gordura e valor calórico, a fim de adequá-lo às necessidades de cada receptor. Em função dos baixos valores encontrados em ambas as metodologias para a concentração de gordura, um pool de vários leites classificados pelo método do crematócrito poderia ser uma alternativa para elevação destes valores. Apesar de não ser esta uma rotina dos Bancos de Leite, poder-se-ia alcançar uma melhoria e padronização dos teores do leite humano processado em Banco de Leite, utilizando-se dos valores do método do crematócrito.

4.6 ADEQUAÇÃO DOS MINERAIS

Os valores médios encontrados neste estudo, apresentados na Tabela 30 e graficamente na Figura 13, demonstram que a concentração dos minerais no leite humano pode estar aquém das necessidades do RNBP, quando se avaliam as suas recomendações. Este resultado vem ao encontro de outros estudos que também concluíram que o leite maduro pode não atender a estas necessidades (AAP, 1985; SCHANLER, 1995; HEINEN et al., 1995; FRIEL et al., 1999; FAERK, 2000).

TABELA 30 – COMPARAÇÃO ENTRE AS RECOMENDAÇÕES PARA O RNBP E A CONCENTRAÇÃO MÉDIA NO LEITE MADURO OBSERVADA NESTE ESTUDO

NUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO MÉDIA NO LEITE MADURO	RECOMENDAÇÕES AAP-1985	RECOMENDAÇÕES NCCPS – 1995	RECOMENDAÇÕES ESPGAN – 1987
Cálcio	17,87 mg/dL	167mg/ ou 139mg/dL	160-240mg/ ou 133-200mg/dL	70-140mg /100Kcal
Fósforo	9,97 mg/dL	114mg/ ou 63 mg/dL	77mg/-64mg/dL	50-90mg /100Kcal
Magnésio	2,47 mg/dL	7,8mg/ ou 4,33mg/dL	4,9-9,7mg/ ou 4,1-8,1mg/dL	6mg/100Kcal
Sódio	16,27 mg/dL	62mg/ ou 50mg/dL	27-91mg/ ou 22,5mg-75mg/dL	6,5-15mmol/L
Potássio	35,52 mg/dL	90mg/ ou 50 mg/dL	97-136mg/ ou 81-113mg/dL	15-25mmol/L
Zinco	0,46 mg/dL	0,5mg/100Kcal ou 0,4 mg/dL	—	0,55mg/100Kcal

FONTES: AAP: American Academy of Pediatrics - Comittee on Nutritional Needs of Low Birth Weight
 NCCPS: Nutrition Comittee, Canadian Paediatric Society - Nutrient Needs and Feeding of Premature Infants
 ESPGAN: European Society of Paediatric Gastroenterology In A Nutrition - Comittee on Nutrition of the Preterm Infant

No item cálcio, as recomendações da AAP (1985), ESPGAN (1987) e NCCPS (1995) para RNBP deveriam ser de 133 a 200mg/dL, em média. Em todas as categorias, os valores mostraram-se muito abaixo destas recomendações. No caso do leite maduro, cuja demanda é maior nos Bancos de Leite, os valores médios encontrados foram de 17,87mg/dL, totalizando apenas 13% das necessidades. Estes baixos valores já eram esperados. Estão, porém, abaixo dos valores médios para leite humano maduro, que seriam de 22mg/dL, e semelhantes para colostro e leite de RNPT

(SCHANLER, 1998).

Segundo FAERK et al. (2000), o leite humano não satisfaz as necessidades do RNBP, apenas suprimindo até 25% do que se recomenda.

No item fósforo, os valores médios também se apresentaram muito abaixo das recomendações, que estariam entre 64 a 102mg/dL. Foram encontrados também valores médios menores para o leite processado em Bancos de Leite, quando comparados aos valores padrões de 14mg/dL (SCHANLER, 1998).

No item magnésio, o valor médio de 2,47mg/dL para o leite maduro é similar aos apresentados como concentração média da composição do leite humano, de 2,5mg/dL (SCHANLER, 1998). Estes valores, no entanto, estão abaixo dos recomendados para RNBP, que seriam de 4,05-8,1mg/dL (NCCPS, 1995).

No item potássio, os valores de 35,52mg/dL encontrados também estão abaixo dos valores médios para o leite humano maduro (50,3mg/dL) e um pouco mais elevados para o colostro e o pré-termo, embora, de qualquer forma, aquém dos valores recomendados para o RNBP, de 64 mg/dL (NCCPS, 1995).

No item sódio, os valores médios encontrados para o leite maduro, de 16,27mg/dL, também estão abaixo das recomendações (NCCPS, 1995).

No item zinco, o perfil dos leites estudados apresentou-se dentro dos valores para leite humano e de conformidade com as recomendações, que são de 0,5mg/dL (AAP, 1985).

Este estudo revelou uma variação importante entre as doadoras, que pode influenciar o desenvolvimento do receptor, no caso específico do leite do Banco de Leite.

A variação pode resultar das características específicas da nutriz, mas também da coleta, processamento, procedimentos na alimentação, tempo de lactação e variações durante as diversas fases da secreção (GROSS et al., 1980; ATKINSON et al., 1981; ANDERSON et al., 1981, 1983; BUTTE et al., 1984; PIERSE et al., 1988; JAIN e BIJLANI, 1989; COSTA, et al., 1991; MICHAELSEN et al., 1994;

LAWRENCE, 1994; SCHANLER, 1995; HAMOSH, 1995; PAUL, 1997; FERRIS et al., 1997; MENA e MILAD, 1998; MAAS et al., 1998; MATALOUN e LEONE, 2000).

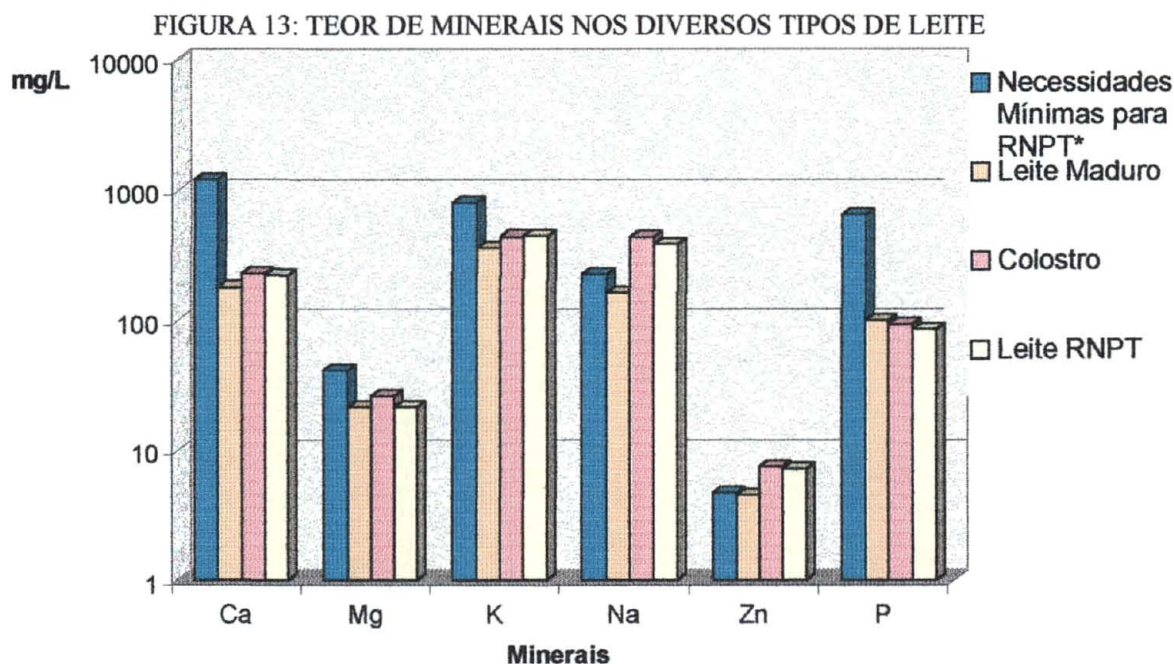
Quando o bebê recebe o leite diretamente de sua mãe, as variações adaptam-se às suas necessidades e características. Do ponto de vista do leite coletado, a não padronização da sua composição pode alterar, porém, a sua qualidade e eficiência.

Os valores do colostro apresentaram-se ligeiramente superiores aos do leite maduro e RNPT, com exceção do fósforo (GROSS, 1980). Mas a sua demanda é limitada no Banco de Leite, tornando-se inviável sua utilização em maior escala.

Os leites de RNPT apresentaram valores mais elevados de Ca, K, Na e Zn, em relação ao leite maduro, como demonstraram outros estudos (LAWRENCE, 1985; GRUMZCH, 1990; CALIL, 1990). Da mesma forma que acontece com colostro, a demanda de leite de RNPT é pequena em Banco de Leite, sendo utilizado prioritariamente para os recém-nascidos filhos das próprias doadoras.

Todos os resultados apontados ao longo deste estudo sugerem que o leite humano processado em Banco de Leite pode ser enriquecido com alguns nutrientes para adaptá-lo às necessidades do RNBP, fato este que vem ao encontro de outros trabalhos (AAP, 1985; SCHANLER et al., 1987; GREER et al., 1988; SCHANLER, 1995; SCHANLER, 1998; CURTIS et al., 1999).

Alguns investigadores observaram que RNBP alimentados com leite humano não enriquecido apresentaram taxas de crescimento mais lentas e inadequada ingestão de nutrientes em relação às suas necessidades específicas (ATKINSON et al., 1981; MODANLOU et al., 1986; MORO et al., 1989; NARAYANAN, 1989; POLBERGER et al., 1989; SCHANLER, 1995; SCHANLER, 1995; WARNER et al., 1998; POLBERGER et al., 1999).



* FONTE: Nutrition Comitee, Canadian Paediatric Society – Nutrient Needs and Feeding of Premature Infants - 1995

4.7 ANÁLISE DO PADRÃO MICROBIOLÓGICO

A Tabela 31 apresenta os resultados da pesquisa dos diferentes microrganismos indicadores, em diferentes tempos, do leite humano processado em Banco de Leite. Os padrões microbiológicos para leite humano de Bancos de Leite são, para cada microrganismo, segundo a Resolução nº 12 (BRASIL, 2001), os seguintes: Aeróbios mesófilos viáveis/mL 10^2 ; coliformes a 35°C ausentes; *Salmonella* sp/25mL ausente e *Staphylococcus* coagulase positiva/mL ausentes.

O padrão microbiológico do leite humano processado em Banco de Leite pode ser avaliado pelas análises do tempo zero. Todas as cinco amostras apresentaram-se dentro dos padrões desejáveis, confirmando a qualidade higiênica do processamento do leite nos Bancos de Leite.

TABELA 31- RESULTADO DA PESQUISA MICROBIOLÓGICA, NOS DIFERENTES TEMPOS DE MANIPULAÇÃO

	MICROORGANISMOS			
	Mesófilos (UFC/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL)	<i>Salmonella</i> em 25 mL	Coliformes a 35°C (UFC/mL)
Amostra 1				
Zero horas	< 1	< 10	Ausência	< 1
12 horas	< 1	< 10	Ausência	< 1
24 horas	< 1	< 10	Ausência	< 1
Amostra 2				
Zero horas	< 1	< 10	Ausência	< 1
12 horas	2×10^2	< 10	Ausência	< 1
24 horas	$3,2 \times 10^3$	< 10	Ausência	< 1
Amostra 3				
Zero horas	< 1	< 10	Ausência	< 1
12 horas	10	< 10	Ausência	< 1
24 horas	10	< 10	Ausência	< 1
Amostra 4				
Zero horas	< 1	< 10	Ausência	< 1
12 horas	< 1	< 10	Ausência	< 1
24 horas	10	< 10	Ausência	< 1
Amostra 5				
Zero horas	< 1	< 10	Ausência	< 1
12 horas	< 1	< 10	Ausência	< 1
24 horas	< 1	< 10	Ausência	< 1

Uma das preocupações no uso do leite humano proveniente de Banco de Leite é sua manipulação nos setores de neonatologia e berçários. Uma vez que o leite pós-pasteurizado será fracionado para administração e aquecido, existe um risco de contaminação do leite e conseqüente alteração de sua qualidade microbiológica.

O objetivo deste estudo foi simular esta manipulação, incluindo o descongelamento, o aquecimento do leite e armazenamento em geladeira doméstica até 24 horas. Desta forma, foram avaliados o tempo de armazenagem, temperatura e o reaquecimento do leite por várias vezes, comum em muitos setores de neonatologia. As amostras foram manipuladas dentro de câmara de fluxo laminar, com material estéril. Assim sendo, outros fatores relacionados com a manipulação e meio ambiente não foram avaliados neste estudo.

Nas amostras de tempo 12 e 24 horas, os resultados revelaram uma manutenção do padrão microbiológico, referente a *Staphylococcus aureus*, coliformes

e *Salmonella*, confirmando mais uma vez a qualidade do leite estocado em Banco de Leite.

A população de mesófilos, porém, aumentou conforme o tempo de estocagem do leite, nas amostras 2, 3 e 4. No caso específico da amostra 2, o leite no tempo 12 e 24 tornou-se impróprio para consumo, segundo a Resolução nº 12 (BRASIL, 2001).

Esta contagem é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos. Mesmo que os patógenos estejam ausentes, um número elevado de microrganismos pode indicar um processamento insatisfatório, havendo condições para que estes patógenos se multipliquem (FRANCO, 2000).

A Figura 14 apresenta uma das etapas da realização das análises microbiológicas.

FIGURA 14 - ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS: ETAPA DE SEMEADURA



O grupo mesófilo inclui a maioria dos contaminantes presentes, permitindo uma visão do padrão microbiológico do leite (MARSHALL, 1992). Este resultado sugere que a manipulação do leite deve ser rigorosa, a fim de manter sua qualidade.

Reutilização de leite já aquecido deveria ser evitada, posto que, além do risco de contaminação, podem ocorrer perdas nutricionais e dos fatores anti-infecciosos (NARAYANAN, 1989). Uma vez que o usuário de leite é uma clientela de alto risco, medidas deveriam ser tomadas a fim de controlar a qualidade deste produto após sua distribuição nos setores de neonatologia.

4.8 DESENVOLVIMENTO DE UM SUPLEMENTO PROTÉICO E DE MINERAIS:

Tomando-se por base os resultados das análises dos macro e micronutrientes minerais, foi possível confirmar que o leite humano produzido em Banco de Leite pode não fornecer todos os nutrientes dentro dos padrões recomendados. Segundo SCHANLER (2001), o uso de fortificante de leite humano provê um adequado crescimento ao recém-nascido de baixo peso, assim como assegura a retenção de nutrientes e índices bioquímicos positivos, quando comparado ao leite humano não fortificado. Comparado, ainda, a fórmulas pré-termo, o leite humano fortificado pode também prover ao lactente significativa defesa contra infecções.

Suplementação com cálcio e fósforo resulta em normalização dos índices bioquímicos, dos níveis de mineral, cálcio sérico, fósforo e fosfatase alcalina, além de excreção urinária de cálcio e fósforo (SCHANLER, 1987; SCHANLER, 2001). Suplementação com sódio resulta em normalização do sódio sérico. Aumento de proteína e energia está associado com aumento das taxas de peso e *status* protéico, incluindo uréia, nitrogênio e albumina sangüíneos (KASHYAP et al., 1990; POLBERGER et al., 1989, SCHANLER, 2001).

Durante a fase de planejamento do suplemento, várias alternativas foram analisadas. Estudou-se, por exemplo, a possibilidade de concentrar leite humano na forma em pó, adquirido por liofilização. A este leite em pó seriam acrescentados minerais. O resultado seria um suplemento rico em todos os elementos presentes naturalmente no leite humano. Para a produção deste suplemento, existiriam, entretanto, pelo menos duas dificuldades: econômicas e operacionais. A primeira seria

a aquisição pelos Bancos de Leite de um liofilizador; a segunda, o elevado volume de leite humano necessário ao preparo do suplemento.

Lembrando que um dos objetivos do desenvolvimento do suplemento é chegar a um produto econômica e operacionalmente viável, optou-se por um suplemento de simples preparo e de baixo custo. O preparo propriamente dito limita-se à pesagem dos ingredientes (em pó), sua homogeneização num vidro ou béquer estéril, com bastão estéril, seguindo-se o envasamento em recipiente apropriado. O uso de um vidro âmbar seria boa alternativa para armazenagem do suplemento, podendo ser reutilizado nos Bancos de Leite, como se procede com os vidros destinados ao leite pasteurizado, com a vantagem, inclusive, de proteger o produto contra possíveis interferências da luz.

Com base nos resultados das análises dos macronutrientes e minerais, considerou-se que os itens proteína e minerais, com exceção do zinco, representariam os elementos com valores mais aquém das recomendações para recém-nascidos de baixo peso. Utilizaram-se como ingredientes fonte protéica (hidrolisado) e fontes minerais.

O hidrolisado de proteína de concentrado de soro de leite, comercialmente denominado ALITAL 821, foi gentilmente cedido pela empresa New Zeland (NZMP). Segundo descrições do fabricante, a proteína hidrolisada é produzida através de tratamento enzimático, controlado, do concentrado protéico de soro de leite, para produzir aminoácidos, peptídeos e polipeptídeos. A proteína de soro de leite utilizada como base para este processo é de alto valor nutricional e, uma vez que o tratamento enzimático é um processo sensível e cuidadosamente monitorado, os aminoácidos essenciais permanecem intactos e a proteína conserva o seu valor nutricional. O produto é recomendado para fórmulas infantis com redução de alergenicidade, produto enteral de fácil absorção e produtos nutricionais com baixo teor de lactose. A Tabela 7 apresenta as características gerais do produto. Para o desenvolvimento de uma fórmula hipoalergênica, devem-se incluir estudos para determinar o perfil do peso molecular do

residual peptídico, a quantidade de residual imunológico presente no material e a habilidade do produto para sensibilizar ou provocar reações em modelos animais (AAP, 2000). Segundo as informações do fabricante (NewZeland), o hidrolisado ALITAL 821 demonstrou, através de teste de Elisa, pelo seu baixo peso molecular e baixo resíduo de beta lactoglobulina, ser um produto indicado como ingrediente hipoalergênico.

TABELA 32 - CARACTERÍSTICAS DO HIDROLISADO PROTÉICO

ESPECIFICAÇÕES	ALITAL 821
Energia (Kcal/100g)	378
Proteína (%)	92,5
Gordura (%)	0,2
Lactose (%)	0,4
Cálcio (mg/100g)	212
Sódio (mg/100g)	556
Potássio (mg/100g)	552
Cloreto (mg/100g)	114
Fósforo (mg/100g)	187
Magnésio (mg/100g)	-
Solubilidade (%)	100
Umidade (%)	4,1
Cinzas (%)	2,1
Residual Beta-lactoglobulina (%)	<0,1
Peso Molecular (Dalton)	90% <5000 (média 390)

FONTE: New Zeland

Estudos demonstraram que fórmulas de hidrólise extensiva responderam como fórmula hipoalergênica em crianças alérgicas ao leite bovino. Crianças com alto risco de desenvolvimento de alergia (história familiar) podem se beneficiar com fórmulas parcialmente hidrolisadas (AAP, 2000). Levando-se em conta que o grau de hidrólise utilizado no suplemento chegou ao nível de 29%, o produto poderia enquadrar-se como adequado ao uso de fórmula infantil para recém-nascidos de risco.

No que diz respeito ao perfil de aminoácidos, a Figura 15 mostra uma comparação dos nove aminoácidos essenciais encontrados no leite humano e no hidrolisado utilizado como ingrediente do suplemento. Os valores mais baixos de fenilalanina do hidrolisado podem ser benéficos ao recém-nascido de baixo peso,

sujeito a altos níveis séricos deste aminoácido e com risco de seqüelas tardias no sistema nervoso (LAWRENCE, 1989). A concentração de triptofano do hidrolisado, próxima do contido no leite humano, também é um item importante, uma vez que este aminoácido é precursor da serotonina (WIT, 1998).

As diferenças mais significativas situam-se na concentração de leucina, lisina e treonina, que são superiores no hidrolisado, comparado ao leite humano. Considerando-se, porém, que o suplemento não significará de forma decisiva o perfil de aminoácidos do leite humano suplementado, estas diferenças podem não representar prejuízo ao seu perfil biológico, diferente quando do uso exclusivo de fórmulas à base de leite bovino.

Os minerais aminoácidos quelatos foram cedidos pelo Laboratório Albion, sob as seguintes formas comerciais: Cálcio Tast Free (13% Ca); Magnésio Tast Free (8% Mg); Fósforo Complexo Albion (18% Mg); Potássio Complexo Albion (18%).

Os minerais aminoácidos quelatos são orgânicos, seguros e bem tolerados, como os minerais encontrados na alimentação. São, por definição, formados quando duas ou mais porções separadas e únicas de uma molécula de aminoácido formam uma ligação coordenada covalente e iônica com um íon metálico, formando uma estrutura anelar (ASHMEAD, 1989).

Quanto aos níveis de gordura, optou-se por uma metodologia de padronização do leite humano, com níveis mínimos de 3g%, dentro da rotina do Banco de Leite. Uma vez que o estudo comparativo entre o crematócrito e o Gerber comprovou a eficiência do primeiro na análise de gorduras, torna-se possível minimizar as flutuações dos nutrientes, utilizando-se este instrumento de classificação.

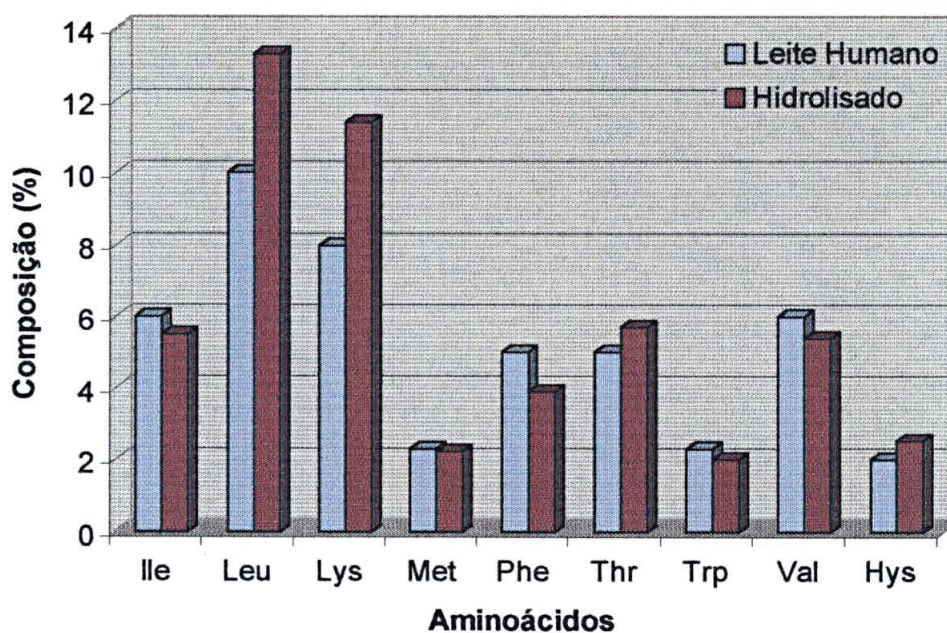
Acompanhando 524 análises do crematócrito, no período de maio a junho de 2001, no Banco de Leite do município de Ponta Grossa, foi possível constatar que 46% apresentaram valores mínimos de 3g% de gordura.

Uma triagem destes leites para posterior mistura ao suplemento resultaria num produto ideal quanto aos níveis de gordura, seguro e sem custo adicional. Os

leites que apresentassem valores abaixo deste índice poderiam ser utilizados para outros lactentes, ou mesmo misturados a outros com valores altos (acima de 3,5%), formando um pool de leites (NARAYANAN, 1989).

Têm-se utilizado suplementos de gordura em fortificantes para o leite humano, principalmente ácidos graxos de cadeia longa (acima de 12 carbonos). Triacilgliceróis de cadeia média são bem tolerados e estão presentes em muitas fórmulas (ESPGAN, 1987; AAP, 1985). No que se refere ao metabolismo das gorduras, o RNPT não apresenta, porém, bom desempenho (AAP, 1985). A absorção de gordura tem-se mostrado mais eficaz no leite humano, havendo um consenso de que o leite humano promove mais rápido esvaziamento gástrico, comparado a fórmulas infantis (SCHANLER, 1995).

FIGURA 15. DIFERENÇAS NA COMPOSIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS ENTRE LEITE HUMANO E HIDROLISADO ALITAL (BASEADO EM WIT, 1998)



Quando óleos vegetais que contêm triacilgliceróis de cadeia média são

usados, pode ocorrer a separação como glóbulos e aderência na seringa e tubo. Pelo método convencional de gavagem, o óleo flutua no topo e pode nem mesmo alcançar o estômago do lactente em quantias adequadas (NARAYANAN, 1989; MATALOUN e LEONE, 2000; MENA e MILAD, 1998).

A utilização de uma fonte de gordura como matéria-prima do suplemento teria um outro inconveniente, que seria a interferência na estabilidade do produto, quanto a possíveis reações de oxidação lipídica. Sabe-se que a oxidação lipídica deteriora a qualidade sensorial, física e química dos alimentos, e leva à produção de substâncias tóxicas às células e ao organismo (FERRARI e TORRES, 2000; FERRARI, 2000). Para garantir a qualidade do suplemento, seria necessário incluir aditivos (antioxidantes) para minimizar os efeitos das reações oxidantes.

Alguns trabalhos têm reportado que o crescimento com adição de triacilgliceróis não é necessariamente maior do que quando se utiliza somente leite humano (RONNHOLM et al., 1986).

Diante da realidade dos Bancos de Leite estudados, considerou-se viável a manipulação de um suplemento dentro da própria área física deste setor, sendo possível operacionalmente introduzir na rotina já existente uma nova metodologia.

Para o preparo do suplemento, faz-se necessário uma área limpa e sanitizada. O Banco de Leite do Hospital de Clínicas adquiriu uma câmara de fluxo laminar, que também poderia ser utilizada durante a manipulação do suplemento, garantindo ainda maior qualidade microbiológica do produto.

Para o enriquecimento do leite, seriam adicionados 3,2g do suplemento para 100mL do leite pasteurizado. Para tanto, poder-se-ia utilizar balança ou uma colher-medida padronizada, podendo-se admitir a possibilidade de alterar a concentração dos ingredientes, ou mesmo esta medida, em função das particularidades do lactente.

A adição do suplemento ao leite poderia ser realizada nos próprios Bancos de Leite, no caso de se usar o produto no hospital vinculado, ou nos lactários dos hospitais não vinculados diretamente ao Banco de Leite.

A adição do pó não aumentou significativamente o volume do leite a ser administrado. A dispersão do pó no leite foi adequada. Para misturar 3,2g de pó a 100mL de leite, foi usada a técnica de se adicionar ao pó pequeno volume de leite, misturando-se com um bastão, acrescentando-se a seguir o restante do líquido. A dispersão do suplemento mostrou-se ainda melhor após o aquecimento do leite em temperatura de 36°C.

Após armazenagem em geladeira, observou-se uma sedimentação de parte do suplemento, que evidencia a necessidade de homogeneização a cada distribuição do leite para administração. Vale ressaltar que esta homogeneização já constitui recomendação para o caso de leite não suplementado, não interferindo na rotina de distribuição do leite nos serviços de neonatologia.

SCHANLER (2001) comparou fortificante líquido e na forma de pó. A desvantagem dos suplementos em pó prendem-se à sua menor diluição no leite humano, enquanto que os suplementos líquidos tiveram menor ingestão e retenção de proteínas e menor ingestão de cálcio, fósforo e zinco.

O cálculo da formulação foi efetuado em função do perfil do leite processado em Banco de Leite, segundo os resultados deste estudo. Foi levado em conta, também, a concentração de minerais de cada mistura e sua biodisponibilidade (informado pelo fabricante).

A Tabela 33 apresenta a composição nutricional básica do suplemento, comparada ao leite humano não suplementado, necessidades nutricionais e composição do leite humano suplementado.

Esta formulação tem como meta principal a melhoria nas taxas de proteínas e alguns minerais, atingindo os valores recomendados. Através da adição do suplemento, os níveis de proteína e dos minerais estudados enquadram-se nas recomendações para o RNBP.

O valor calórico não sofreu acréscimo suficiente para atingir os padrões recomendados. Observando-se como padrão mínimo para a concentração de gordura a

taxa de 3g%, o valor mínimo de calorias passou de 61,7 para 72,1kcal%. Com a metodologia sugerida, espera-se uma menor oscilação dos níveis médios de calorias e gordura, fato importante detectado neste estudo. Somando-se a isto, a melhor digestibilidade da gordura do leite humano pode assegurar melhor eficiência do leite enriquecido, mesmo que os valores calóricos não estejam nos patamares recomendados. A adição de fontes de carboidratos poderia aumentar a taxa calórica, como, por exemplo, polímeros de glicose (ISSLER, 1991). Considerou-se desnecessária a incorporação de mais um ingrediente ao suplemento, tendo-se em vista as taxas de lactose encontradas neste estudo, o aumento do custo do produto e a possível interferência na osmolaridade do leite com o acréscimo de fontes de carboidrato (CURTIS, 1999).

A proporção entre cálcio e fósforo manteve-se dentro dos padrões do leite humano, em torno de 2:1. No caso do zinco, fez-se desnecessário sua adição, para atingir os valores recomendados. A Academia Americana de Pediatria (1985) recomenda para crianças nascidas a termo 0,5mg de zinco por 100Kcal, sugerindo que se mantenham os mesmos valores para RNBP.

TABELA 33 - PERFIL NUTRICIONAL DO SUPLEMENTO

Nutriente (em 100g)	Composição leite humano (LH) *	Necessidades/dL**	Composição Suplemento***	Composição suplemento + LH
Calorias (Kcal)	61,7	85 - 112	6,4	72,1 [#]
Proteínas (g)	1,1	2,5 - 3,0	1,6	2,67
Carboidratos (g)	8,6	6,25 - 12,9	0,001	8,6
Lipídios (g)	2,6	3,2 - 5,6	-	3,0 ^{##}
Cálcio (mg)	17,87	120 - 200	94	120
Fósforo (mg)	9,74	64 - 102	54,36	64
Magnésio (mg)	2,47	4,1 - 8,1	2,53	5,0
Sódio (mg)	17,27	22,5 - 75	10,8	28,27
Potássio (mg)	35,52	80 - 113	46,11	81,63
Zinco (mg)	0,46	0,47 - 0,55	-	0,46

NOTA: * composição média do leite humano segundo resultados do presente estudo

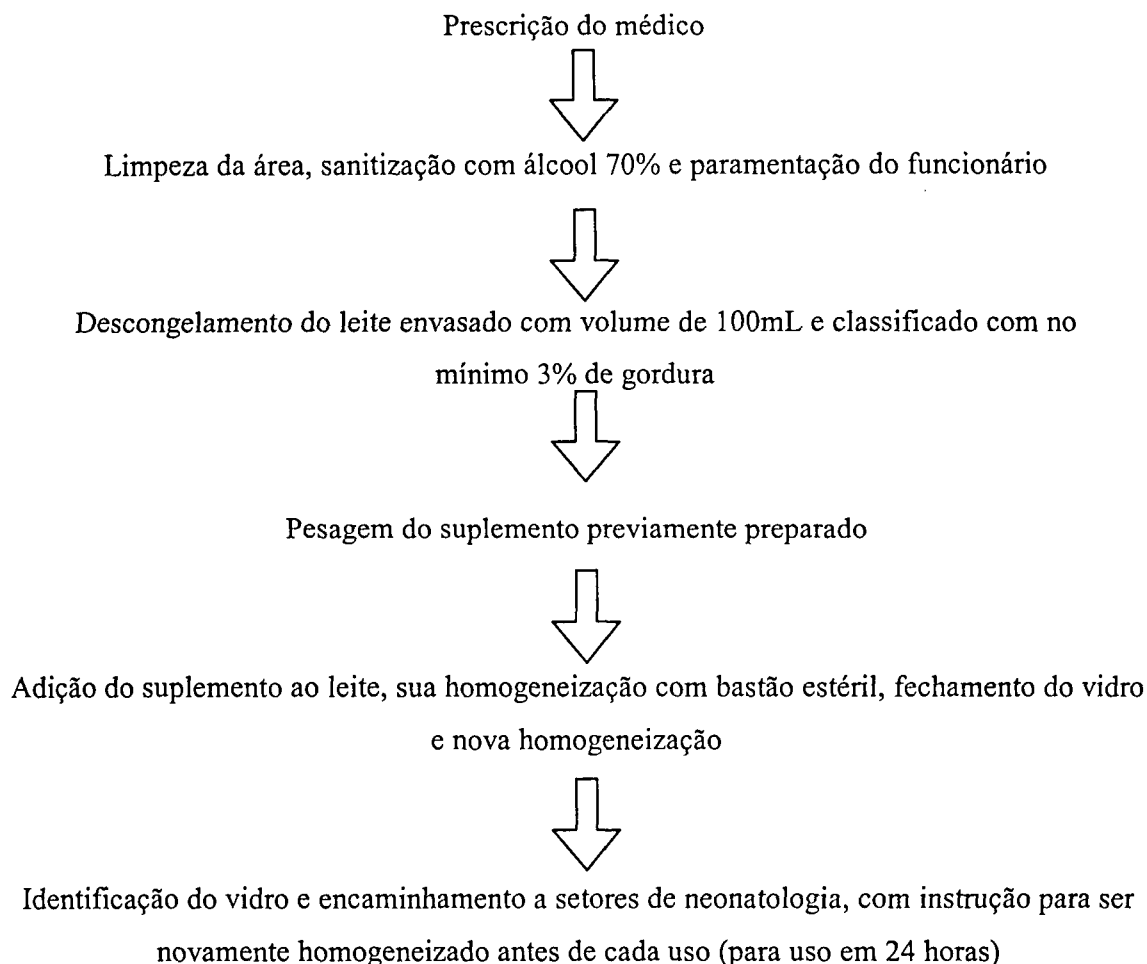
** necessidades baseadas em Nutrition Comitee Canadian Paediatric Society (NCCPS - 1995) e European Society of Paediatric Gastroenterology in a Nutrition (ESGAN 1987)

***composição do suplemento referente a 1 porção de 3,2g para enriquecer 100 mL de leite humano

valor calórico referente a no mínimo 3g de

valor mínimo de baseado na classificação do crematócrito

Para a mistura do suplemento ao leite já pasteurizado, estabeleceu-se a seguinte rotina:



O período de 24 horas para armazenagem do leite suplementado baseou-se na rotina atual, que já delimita este tempo para leite não suplementado, e também no estudo de JOCSOON et al. (1997), que recomenda o uso do leite fortificado até 24 horas após sua preparação, limite determinado pelo aumento do total de colônias bacterianas encontradas após este período.

No que se refere ao custo do suplemento, este foi considerado satisfatório, comparando-se a um produto similar comercializado, representando apenas 40% do custo de um suplemento similar disponível no mercado. O custo do suplemento, somando-se o valor de mercado de todos os ingredientes, totalizou, para uma porção

de 3g, R\$ 0,12, enquanto que um produto similar, em R\$ 0,30, para a mesma porção.

4.8.1 Avaliação da Adição do Suplemento na Qualidade Microbiológica do Leite

O resultado das análises microbiológicas comparando o leite pasteurizado ao leite pasteurizado adicionado de suplemento demonstrou ser segura esta rotina, não interferindo na qualidade do leite já pasteurizado. O resultado final das análises, segundo a Resolução nº 12, foi o seguinte:

- aeróbios mesófilos viáveis/mL : < 1 UFC/mL
- coliformes a 25°C: < 1 UFC/mL
- *Staphylococcus* coagulase positiva: < 10 UFC/mL
- *Salmonella sp*: ausência em 25mL

4.8.2 Avaliação da Adição do Suplemento no Total de IgA do Leite Humano

O resultado das análises de IgA nas amostras de leite *in natura* puro e adicionado do suplemento, assim como nas de leite pasteurizado puro e adicionado do suplemento, sugere não ocorrer interferência do suplemento na concentração de IgA (QUAN et al., 1994; JOCSOON et al., 1997). A concentração do total de IgA foi similar entre os leites suplementados e não suplementados.

Levando-se em conta que estas análises foram testes preliminares da interferência do suplemento na composição de IgA, outros estudos seriam recomendados futuramente, incluindo fatores como tempo e temperatura.

4.8.3 Análise da Atividade da Água do Suplemento

A Figura 16 apresenta os resultados da determinação da atividade de água (A_w). Observa-se um aumento da atividade de água em função do tempo de armazenamento do suplemento. O hidrolisado, matéria-prima base do suplemento, é um produto higroscópico, podendo ser o principal responsável por esse aumento da A_w .

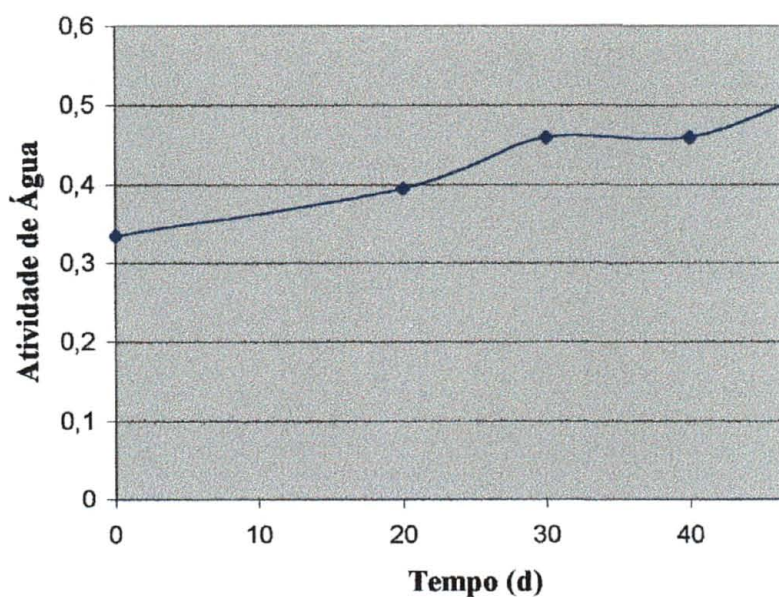
A maioria das bactérias deteriorantes não se multiplica em A_w inferior a 0,91, enquanto que fungos deteriorantes podem fazê-lo em A_w de até 0,80. Relativamente às bactérias causadoras de toxinfecções alimentares, o *Staphylococcus aureus* pode tolerar A_w até 0,86 para multiplicação microbiana. Os valores de A_w mais baixos relatados na literatura, relacionados com multiplicação bacteriana, são de 0,75 para bactérias halofílicas, 0,65 para bolores xerofílicos e 0,60 para leveduras osmofílicas (FRANCO, 2000).

Segundo BOBBIO (2001) e AQUARONI et al. (1990), atividade de água abaixo de 0,6 proporciona pequeno ou nenhum crescimento microbiano.

Tratando-se de um alimento para uma clientela de risco, o preparo do suplemento em intervalos de 20-30 dias poderia garantir a qualidade microbiológica do produto.

Para uma comprovação mais eficaz do tempo de prateleira do suplemento, seria necessária uma avaliação por períodos mais prolongados que os 50 (cinquenta) dias em que se desenvolveu o estudo.

FIGURA 16 - ATIVIDADE DE ÁGUA DO SUPLEMENTO EM DIFERENTES TEMPOS DE PREPARO



5 CONCLUSÃO

O estudo realizado e os resultados obtidos descritos nesta dissertação permitem destacar as seguintes conclusões:

- Os Bancos de Leite estudados possuem uma estrutura operacional compatível com a introdução de uma metodologia para produção de um suplemento específico para o leite humano.

- Os dados expostos ao longo deste estudo demonstram que, em virtude da baixa concentração e variação na composição, o leite humano processado em Banco de Leite pode estar aquém das necessidades nutricionais do RNBP, fazendo-se justificável uma adequação, através da adição de suplemento protéico e de minerais.

- Foram encontradas baixas taxas de lipídios, fenômeno passível de ser amenizado através de uma classificação da concentração deste nutriente, utilizando-se a técnica do crematócrito, a qual demonstrou ser eficiente.

- O padrão microbiológico do leite humano processado em Banco de Leite apresentou-se dentro dos padrões desejáveis, evidenciando sua qualidade higiênica.

- Foi constatada a viabilidade operacional e financeira do desenvolvimento de um suplemento protéico e de minerais, proposto para ser adicionado ao leite humano processado em Banco de Leite, a fim de fortificá-lo e adequá-lo às necessidades do RNBP.

- O preparo e manipulação do suplemento desenvolvido não interferiram no padrão microbiológico e na concentração de IgA do leite humano, sendo preservada sua qualidade sanitária e imunológica.

- A atividade de água do suplemento mostrou-se de acordo com os padrões para produto desidratado e abaixo dos níveis críticos para o crescimento microbiano.

Os resultados deste estudo focalizaram os aspectos técnicos para a produção segura de um suplemento para o leite humano. Aspectos clínicos, não incluídos como objetivos deste estudo, mas perfeitamente viáveis como objeto de futuras pesquisas, poderão confirmar a segurança e eficácia do produto ora desenvolvido, ensejando então sua utilização efetiva na prática dos Bancos de Leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLFO LUTZ: NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos químicos e físicos para análises de alimentos. Instituto Adolfo Lutz. Governo do Estado de São Paulo, 3.ed., 1985, 533pg.

ALMEIDA, J.A.G. Amamentação: um híbrido natureza-cultura. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1999.119p.

ALLEN, J.C et al. Studies in human lactation: milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v.54, n. 1, p. 69-80, 1991.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS (AAP). Committee on Nutritional needs of low birth weight. Pediatrics, Chicago, v.75, n.6, p.976-986, 1985.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS (AAP). Breastfeeding and the use of Human Milk. Pediatrics, Chicago, v.100, n.6, p.1035-1039, 1997.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Hypoallergenic Infant Formulas. Pediatrics, Chicago, v.106, n.2, p346-349, 2000.

ANDERSON, J. H. The effects of premature on milk composition and physiological basis. Fed Proc., [SI.], v.23, n.3, p.438, 1984

ANDERSON, D.M et al. Length of gestation and nutritional composition of human milk. Am J. Nutr., Bethesda, v.37, n.4, p. 810-814, 1983.

ANDERSON, G.H.; ATKINSON, S.A.; BRYAN, M.H. Energy and macronutrient content of human milk during early lactation from mothers giving birth prematurely and at term. Am. J. Nutr., Bethesda, v.34, n. 2, p.258-265, 1981.

ANDERSON, D. Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. IN: MAHAN,L.K.; STUMP, E.S Nutrição no Cuidado do bebê de baixo peso ao nascimento. 9.ed. Rio de Janeiro: Roca, 1999. 957p. p.231-257.

AQUARONI, E.; BORZANI, W.; LIM, U.A. Tópicos de Microbiologia Industrial. In: AQUARONI, E.; BORZANI, W.; LIM, U.A. Microrganismos em Alimentos. São Paulo: editora da Universidade de São Paulo, v.2, 1990, 231p., p. 116-118.

ASHMEAD, H.D. Nutrição e minerais aminoácidos quelatos. São Paulo: Attar Editorial, 1989, 318p.

ATKINSON, S.A.; et al. Macromineral balances in premature infants fed their own mothers' milk or formula. J. Pediatr., St. Louis, v.102, n.1, p.99-106, 1983.

ATKINSON, S.A.; ANDERSON, G.H.; BRYAN, M.H. Human Milk: difference in nitrogen concentration in milk from mothers of term and premature infants. J. Pediatr., St. Louis, v.93, n.1 p.67-69, 1978.

ATKINSON, S.A.; ANDERSON, G.H.; BRYAN, M.H. Human Milk feeding in premature infants; protein, fat, and carbohydrate balance in the first two weeks of life. J. Pediatr., St. Louis, v. 99, n.5, p.617-624, 1981.

AOAC: Official methods of the Association of Official Analytical Chemists. 17ed. Gaithersburg, 2000. 1141p.

AKRE, J. Infant feeding: the physiological basic. Geneva: World Health Organization, 1989. 108p.

BENKOV, K.; LELEIKO, N.S. A rational approach to infant formulas. J. Pediatr., St. Louis, v.16, p.225-230, n.3, 1987.

BOBBIO, P.; BOBBIO, F.O. Química de Processamento de Alimentos. In: BOBBIO, P.; BOBBIO, F.O. Água. 3.ed. São Paulo: Varela, 2001. 151p. p. 11-18.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária. Portaria nº 322 de 26 de maio de 1988. Aprova as normas gerais para regular a instalação e funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p 9526-9259, 27 de julho de 1988a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária. Portaria nº 977 de 05 de dezembro de 1998. Aprova a norma brasileira para comercialização de alimentos para lactentes, a ser observado em todo território nacional e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n.249, p.14401-14402, 13 de out. 1998b. Seção 1.

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

BRASIL. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição-INAN. Normas Gerais para Bancos de Leite Humano. Brasília. 1998d. 20 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição (INAN). Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (PNIAM). Brasília, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária. Resolução nº12 de 12 de janeiro de 2001. Define os critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.

BRASIL, A.L.D. Composição lipídica e protéica do leite de adolescentes de alto e baixo nível sócio-econômico, comparado com adulta. São Paulo, 1988. 175p. Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina.

BHATIA, J. et al. Effect of Protein/energy Ration on Growth and Behavior of Premature Infants: Preliminary Findings. J. Pediatr., St. Louis, v.118, n. 1, p.103-110. 1991.

BJORKSTEN, B. et al. Collecting and banking human milk. To heat or not to heat. Br. Med. J., London, v. 281, n.9, p.765-766, 1980.

BOERSMA, E.R. et. al. Vitamina E, lipid fractions, and fatty acid composition of colostrum, transitional milk, and mature milk: in international comparative study. Am. J. Clin. Nutr., v.53, n.5, p.1197-1204, 1991.

BUTTE, N.F. et al. Longitudinal changes in milk composition of mothers delivering preterm and term infants. Early Human Development, [S. 1], v.9, n.1, p.153-162, 1984.

CANDIDO, L.M. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais. Campinas, 1998. 291p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.

CALIL, V.M.L.T. Nutritional composition of colostrum of mothers of infants of adequate and small size for gestational age. São Paulo, 1990, Tese de mestrado em medicina. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo.

CHANDRA, R.K. Food allergy: A Live tiger or a paper tiger? Nutr. Res., Chicago, v.19,n.1, p.1-2, 1999.

CHAN, G.M.; MILEUR, L.H.; Calcium and phosphorus requirements in bone mineralization of preterm infants. J. Pediatr., St. Louis, v. 113, n.2, p. 225-229, 1988.

CHAN, M.C, Grow and bone mineral status of discharged very low birth weight infants fed different formula or human milk. J. Pediatr., St. Louis, v. 123, n.3, p. 439-443, 1993.

CHESSEX, P.; REICHMAN, B.; VERELLEN, G.; et al. Quality of growth in premature infants fed their own mothers milk. J. Pediatr., St. Louis , v.102, n.2, p.107-112, 1983.

CLARK, D.A. Nutritional Requirements of The Premature and Small for Gestational age Infant. In: SUSKIND, R.M. & LEWINTER-SUSKIND, L. Textbook of Pediatric Nutrition. 2.ed. New York, Raven Press, 1993.

COELHO, M.R.V. Estudo da composição química (gorduras totais, valor calórico total, proteínas totais, imunoglobulinas e ácidos graxos) do colostro de nutrizes adolescentes. São Paulo, 1988.115p. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina de São Paulo.

CONGDON, P.J.; HORSMAN, A.L.; RYAN, S.W. et al. Spontaneous resolution of bone mineral depletion in preterm infants, Arch. Dis. Child., London, v. 65, n.9, 1038-1042, 1990.

COPPA, G.V. et al. Qualitative and quantitative studies of carbohydrates of human colostrum and mature milk. Int. J. Pediatr., Bethesda, v.17, n.2, p.303-307, 1991.

CORDLE, C.T. Control of food allergies using protein hydrolysates. Food Technology, Chicago, v.48, n.10, p. 72-76, 1994.

COSTA, M.C.O. et al Estudo do perfil lipídico do colostro de adolescentes mães de recém-nascidos prematuros. J. Pediatria., Porto Alegre, v.67, n.7, 1991.

CURTIS, M.D.; CANDUSSO, M.; PIELTAIN, C. Effect of fortification on the osmolarity of human milk. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal, London, n 81, v.2, p.141-143, 1999.

DANG, H.S. et al. Concentrations of four essential trace elements in breast milk of mothers from two souci-economic groups: preliminary observations, Sci. Total Environ, [S1], v. 35, n.1, p- 85-89, 1984.

DARWISH, A.E.H et al. Comparative study on breast milk of mothers delivering preterm and term infants. Protein, fat and lactose. Nahrung, [S.1], v.33, n.2, p.249-251, 1989.

DAWODU, A.H.; OSIBANJO, O.; DAMOLE, I. O. Nutrient composition of milk produced by mothers of preterm infants in Nigeria. East African Medical J., [S. 1], v.67, n.7, p. 873-877, 1990.

DINIZ, M.A..et al.. Recém-Nascido de Baixo Peso ao Nascer. IN: MARCONDES E.; LIMA I.N. Dietas em Pediatria Clínica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 222p. p.67-72

EUCLYDES, P.M. Nutrição do Lactente: base científica para uma alimentação adequada. In: EUCLYDES, P.M. Aleitamento Materno. Viçosa: Jard/Produções Gráficas, 1997. 461p.

ESCRIVÃO, A.M. et al. Concentrations of iron, zinc, copper, calcium, phosphorus and magnesium in the colostrum of adult mothers from two socioeconomic levels. IN: NÓBREGA, F.J. IN: Human Milk Composition. São Paulo; Revinter, 1996. 236p. p.135-149.

EUROPEAN SOCIETY OF PAEDIATRIC GASTROENTEROLOGY NA NUTRITION (ESPGAN): Comitee on Nutrition of the preterm infant, European Society for Paediatr. Acta Paediatr. Scand., Helsink, s.336, p. 1-14, 1987.

EWER, A.K.; VYH, Y. Gastric emptying in pre-term infants: the effect of breast milk fortifier. Acta Paediatr., London, v. 85, n.10, p. 1112-1115, 1996.

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.

FAERK, J. et al. Diet and Bone Mineral Content at Term in Premature Infants, Pediatric Res., Baltimore, v.47, n.1, p. 148-156, 2000.

FRANCO, L.V.; PRIMERA, E.B.; CAMACHO, C.M. Manganeso, cobre, hierro y molibdeno en la secreción temprana de colostro humano. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex., Mexico, v.44, n.2, p.86-91, 1987.

FRANCO, B. Fatores intrínsecos e extrínsecos que controlam o desenvolvimento microbiano nos alimentos. IN: FRANCO, B.D.G.M.; LANFGRAF, M. IN: Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2000. 182p. p.13-16.

FERRARI, C.K.B.; TORRES, E.A.F.S. Fatores físicos e bioquímicos da industrialização, preparo e armazenamento de alimentos e sua relação com radicais livres e a oxidação lipídica. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 14, n.68/69, 2000.

FERRARI, C.K.B. Fatores bioquímicos e físicos pró e anti-oxidantes, relacionados à oxidação lipídica dos alimentos. Higiene Alimentar, São Paulo, v.11, n58/59, 2000.

FERRIS, A.M et al. Macronutrients in human milk at 2, 12, and 16 weeks postpartum. J.Am Diet. Assoc., Chicago, v.88, n.6, p.694-697, 1988.

FRIEL, J.K et al. Elemental composition of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. Biological-Trace-Element-Research, [S.l], v.67, n.3, p.225-247, 1999.

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

GAMSU, H.R.; NICHOLL, R.M. Changes in growth and metabolism in very low birth weight infants feed with fortified breast milk. Acta Paediatr., London, v.88, n.10, 1056-1061, 1999.

GOLDMAN, A.S. et al. Anti-inflammatory properties of human milk. Acta Paediatr. Scand., Helsing, v.75, n.5, p.689, 1986.

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.

GRANER, C.S.F.; MEIRA, D.R.; MUCCILOLO, P. Determinação de teor de fósforo em produtos cárneos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, v. 35/36, p. 55-62, 1975.

GREER, F.R.; McCORMICK, A.. Improved bone mineralization and growth in preterm infants fed fortified own mother's milk. J. Pediatr, St. Louis, v. 112, n. 9, p. 961-969, 1988.

GROSS. S.J; et al. Nutritional composition of milk produced by mothers delivering preterm. J. Pediatr., St. Louis, v.68, n.4, 490-493, 1981.

GROSS, S.J. Feeding the Low Birth Weight Infant. Clin. in Perinatology, Philadelphia, v.20, n.1, 1993.

GROSS, S.J. Growth and biochemical response of preterm infants fed human milk or modified infant formula. New Engl. J. Med, Londres, v.308,n.2, p.237-241, 1983.

GROSS, S.J. Bone mineralization in preterm infants fed human milk with and without mineral supplementation, J. Pediatr., St. Louis, v. 111, n.4, p.450-458, 1987.

GROSS, S.J et al. Nutritional composition of milk produced by mothers delivering preterm. J. Pediatr., St. Louis, n.4, p.641-644, 1980.

GRUMACH, A.S. A nutritional and immunologic evaluation of breast milk of mothers of low birth-weight newborn infants, São Paulo, 1990, Tese Doutorado em Medicina. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo.

GUERRINI, P.; BOSI G.; CHIERICI, R.; FABBRI, A. Human milk: relationship of fat content with gestational age. Early Human Development, London , v.5, n.2, p.187-194, 1981.

GUERRINI, P. Human milk fortifiers. Acta Paediatr., London, v.83, supl. 402, p. 37-39, 1994.

GUILLOU, N.M.; HENOCQ, A.; BATTANDIER, F.A. L'Hidrolyse des protéines modifie-T-Elle L'Acceptabilité Et La Tolérance Digestive D'Un Lait Pour Nourrissons. Actualité diététique, Paris, v.39, n.3, p. 202-206, 1992.

HAMBREUS, L. Leche humana: aspectos nutricionales. In: HAMBREUS, L. Nutrición clínica en la infancia. New York: Vevey/Reven Press, 1985. 315p. p.289-301.

HAMOSH, M. et al. Lipid composition of preterm human milk and its digestion by infant. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, New York, p.1153-1164, 1985.

HORSMAN, A et al. Osteopenia in extremely low birth weight infants, Arch Dis. Child, London, v.64, n.5, p. 485-488, 1989.

HEINEN, F. et al. Zinc deficiency in an exclusively breast-fed preterm infant. European Journal of Pediatrics, Paris, v.154, n.1, p.71-75.1995.

HUERTA, F.S. et al. Comparación del volumen y composición del calostro extraído com una bomba manual o eléctrica. Boletim Med. Hosp. Infant. Mex., Mexico, v.52, n.8, p.465- 469, 1995.

INNIS, S.M. Human milk and formula fatty acids. J. Pediatr., St. Louis, v.120, n.1, p.56-61, 1992.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). New York. Academy Press, 1980. 434p.

INSTITUTE OF MEDICINE (U.S.). Nutrition during lactation. Washington. National Academy Press, 1991. 309p.

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.

JAMES, J.R.; CONGDON, P.J.; TRUSCOTT, J. et al. Osteopenia of prematurity, Arch. Dis. Child, London. V. 61, n. 7, 871-876, 1986.

JAIN, S.; BIJLANI, R.L. The significance of some significant features of breast milk. Indian J. Physiology and Pharmacology, Nagar, v.33,n.1, p.118-28, 1989.

JENSEN, R.G.; The lipids in human milk. Prog. Lipid. Res., [S.l], v.35, n.1, p.53-92, 1996.

JOCSON, M.A L.; MASON, E.O.; SCHANLER, R. J. The Effects of Nutrient Fortification and Varying Storage Conditions on Host Defense Properties of Human Milk. Pediatrics, Chicago, v. 100, n.2, p.240-243, 1997.

JORGE, S.M et al. Nutrição e Dietética em Pediatria. IN: WOISK, R.J. Alimentação de Recém-nascido pré-termo. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1995.283p. p.89-107.

KELLY, D.; BEGBIER, R.; KING, T.P. Nutritional influences on interactions between bacteria and the small intestinal mucosa, Nutr. Res., [S.1], v.7, p.233-257, 1994.

KASHYAP, S. et al. Growth, nutrient retention, and metabolic response of low-birth-weight infants fed supplemented and unsupplemented preterm human milk. Am. Clin. Nutr, Bethesda, v.52, n.2, p.254-262,1990.

KUNZ. C.; LONNERDAL, B. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. Acta Paediatr, London, v.81, n.2, p.107-112, 1992.

KUSCHEL C.A.; HARDING C.A Protein supplementation of human milk for promoting growth in preterm infants. Cochrane database syst, v.2, 2000. CD 000433.

LAWRENCE, R.A. Biochemistry of human milk. IN: LAWRENCE, R.A. Breastfeeding: a guide to the medical profession. 3.ed. ST Louis: The CV Mosby Company , 1989, 601p. p.73-117

LAWRENCE, P.B. Breast milk. Best source of nutrition for term and preterm infants. Pediatric Clinics of North America, Philadelphia, v.41, n.5, p.925-41, 1994.

LAPILLONNE, A.A. et al. Mineral balance and whole body bone mineral content n very low-birth-weight infants, Acta Paediatr, suppl 405, p. 117-122, 1994.

LEARY, H.L. Nonclinical testing of formulas containing hidroyzed milk protein. J. Pediatr., St. Louis, v. 121, n. 55, p. 42-46, 1992.

LEARY, M.J. Nourishing the premature and low birth weight infant. Seattle, WA: Ncast Publication, [SL], 1989. 342p.

LEE, Y.H. Food-processing approaches to altering allergenic potential of milk-based, J. Pediatr., St. Louis, v. 121, n. 55, p. 47-50, 1992.

LEMONS, J.A ; MOYEL, H.L; SIMMONS, M. Differences in the composition of preterm and term human milk during early lactation. Pediatric. Res., Baltimore, v.16, n.1, p.113, 1982.

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

LO, C.W.; KLEINMAN, R.E. Infant formula, past and future: opportunities for improvement. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 63, n.4, p. 645-650, 1996.

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

LUCAS, A. et al. Crematocrit: Simple Clinical Technique for Estimating Fat Concentrating and Energy Value of Human Milk. Br. Med. J., London, v.1, n.9, p.1018-1020, 1978.

LUCAS, A et al. Randomized outcome trial of human milk fortification and developmental outcome in preterm infants. Am. Clin. Nutr., Bethesda, v.64, n.1, p.142-151, 1996.

LUCAS, A; COLE, T.J. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. Lancet, London, v. 336, n.8730, p.1519-23, 1990.

LUCAS, A. et al. Multicentre trial on feeding low birth weight infants: effects of diet on early growth. Arch. Dis. Child., v.59, n.9, p.722-730, 1984.

LUCAS A., LUCAS P.J., CHAVIN, S.I., LYSTER, R.L.J., BAUM, J.D. A human milk formula. Early Human Development, Londres, v.4, n.1, p.15-21, 1980.

LUUKKAINEN, P.; SALO, M.K.; NIKKARI, T. The fatty acid composition of banked human milk and infant formulas: the choices of milk for feeding preterm infants. European J. Pediatric, Paris, n.154, v.2, p.316-319, 1995.

MAAS, Y.G.H et al. Development of macronutrient composition of very preterm human milk. British Journal of Nutrition, London, v.80, n.1, p.35-40, 1998.

MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. Food Technology, Chicago, v.48, n.1, p.89-94, 1994.

MALLET, E.; HENOCQ, A. Long-term prevention of allergic diseases by using protein hydrolysate formula in at-risk infants. J. Pediatr., St. Louis, v.121, n.5, p.95-100, 1992.

MARSHAL, R.T. Standard Methods for the examination of Dairy Products. In: MARSHAL, R.T. Pathogens in milk and milk products. 16.ed. New York: APHA, 1992, 342p. p.103-125.

MATALOUN, M.M.G.B.; LEONE, C.R. Human milk mineral intake and serum concentrations of calcium and phosphorus in newborn term infants: Influence of intrauterine growth restriction Acta Paediatr., London, v. 89, n.9, p. 1093-1097, 2000.

MARK, H.E.; JEFFERY, A.S.; DOUGLAS, C.H. Anaphylaxis after ingestion of a recently introduced hydrolyzed whey protein formula. J. Pediatr., St. Louis, v.118, n.1, p.74-77, 1991.

MENA, P.N.; MILAD, M.A Variaciones en la composición nutricional de la leche materna. Algunos aspectos de importancia clínica. R. Chilena de Pediatría, Santiago, v.69, n.3, p.116-121, 1998.

McCLURE, R.J.; NEWELL, S.J. Effect of fortifying breast milk on gastric emptying. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal, London, v. 74, n.1. p. 60-62, 1996.

MICHAELSEN, K.F. et al. The Copenhagen Cohort Study on Infant Nutrition and Growth: breast milk intake, human milk macronutrient content, and influencing factors. Am. Clin. Nutr., Bethesda, v.59, n.4, p.600-611, 1994.

MOODY, G.J.; SCHANLER, R.J.; SHUMAN, R.J. Feeding tolerance in premature infants fed fortified human milk. J. Pediatrics. Gastroenterol Nutr, Texas, v.30, n.4, p.408-412, 2000.

MODANLOU, H.D. et al. Growth, biochemical status, and mineral metabolism in very low birth weight infants receiving fortified preterm human milk. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr, Philadelphia, v.5,n.762-767,1986.

MORO, G.E. et al. Growth and metabolic responses in low-birth-weight infants fed human milk fortified with human milk protein fortified human milk or a with a bovine milk protein preparation. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., Philadelphia, v.13, n.1, p.150-154, 1994.

NARAYANAN, I. Human Milk for Birthweight infants: Immunology, Nutrition and Newer Practical Technologies. Acta Paediatr, London, v.31,n.4.p.455-461, 1989.

NARAYANAN, I., PRAKASH, K; BALA, S. Partial supplementation with expressed breastmilk for prevention of infection in low-birth-weight infants, Lancet, v.2, p.561-563, 1980.

NEVILLE, M.C.; KELLER, R.; SEACAT, J.; et al. Studies in human lactation: volumes in lactating woman during the onset of lactation and full lactation. Am. Clin. Nutr, Bethesda, v.48, n.7, p.1375-1386, 1988.

NEWMAN, J. How Breast Milk Protects Newborns. Scientific American, [S..L.], v.1, n.1, p.58-61, 1995.

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

NUTRITION COMMITTEE, CANADIAN PEDIATRIC SOCIETY (NCCPS). Nutrient needs and feeding of premature infants, Canadian Med. Association J., Ottawa, v.52, n.11, p. 1765-1785, 1995.

NOVO NORDISK. Enzymatic hydrolysis of proteins using Novo Nordisk proteases. Bagsvaerd: Novo Nordisk A/S; Enzyme Business, 1995, 4p. Application sheet.

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

PANYAM, D.; KILARA, A.. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. Trends in Food Science and Technology, [S.L], v. 7, n.4, p.120-125, 1996.

PAUL, V.K. et al. Macronutrient and Energy content of Breast Milk of Mothers Delivering Prematurely. Indian J. Pediatr. New Delhi, v.64, n.3, p.379-382, 1997.

PEREIRA, G.R.; BARBOSA, N.M.M. Controversies in Neonatal Nutrition. Pediatric Clinics Am., London ,v.33, n.1, p.65-89, 1986.

PIERSE, P.; VAN A.J; CLANDININ, M.T. Nutritional value of human milk. Progress in Food and Nutrition Science, [S.L], v.12, n.2, p. 421-447, 1988.

PINHATA, M.M.; GONÇALVES, L.G. Alimentação do recém-nascido. Pediatria Moderna, São Paulo, v.XXXII, n.1, p.22-32, 1996.

POLBERGER, S.K.T.; AXELSSON, I.A.; RAIHA, N.C. E. Growth of very low birth weigh infants on varying amounts of human milk protein. Pediatr. Res., Baltimore, v.25, n.5, p.414-419, 1989.

POLBERGER, S.; RAIHA, N.C.; JUVONEN, P.; MORO, G.E. et al. Individualized protein fortification of human milk for pretem infants: comparison of ultrafiltrated human milk protein and a bovine whey fortifier. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., Philadelphia, v. 29, n.2, p. 322-338, 1999.

PORCELLI, P. et al. Growth in Human Milk-Fed Very Low Birth Weight Infants Receiving a New Human Milk Fortifier. Am Nutr. Metab., Chicago, v. 44, n.1, p.2-10, 2000.

QUAN, R. et al. The effect of Nutritional Additives on Anti-Infective Factors in Human Milk. Clinical Pediatr., [S.l.], v.33, n.2, p.325-328, 1994.

RAIHA N.C. Nutritional proteins in milk and the protein requirement of normal infants, In: Feeding the normal infant. Pediatrics, Chicago, American Academy of Pediatrics AAP, v.75, (supl.), p. 136-141, 1985.

RAIHA, N.C. Milk protein quantity and quality and protein requirements during development. Adv. Pediatr., [S.l.], v.36, n.2, p.347-368, 1989.

RAIHA, N.C. et al. Milk protein quantity and quality in low weight infants. Pediatrics, Chicago, v.57, n.5, p.659, 1976.

RAJALAKSHMI, K.; SRIKANTIA, S.G. Copper, zinc, and magnesium content of breast milk of Indian women, Am J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 33, n.5, 1980.

REICHMAN B.; CHESSEX P.; PUTET G.; VERELLEN B. et al. Diet, fat accretion, and growth in premature infants. New Engl J Med, Londres, v.305, n.21, p.1495-1500, 1981.

RONNHOLM, K.A.R., PERHEENTUPA, J.; SIIMES, M.A. Supplementation with human milk protein improves growth in small premature infants fed human milk. Pediatrics., Chicago, v.77, n.5, p.649-653, 1986.

SCHANLER, R.J. Nitrogen and mineral balance in preterm infants fed human milks or formula. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., Philadelphia, v.4, n.2, p. 214-219, 1985.

SCHANLER, R.J. Benefícios Clínicos do leite humano para o lactente prematuro. Nestlé Nutrition Workshop Series. Programa Pediátrico, Vevey, n.43, p.20-22, 1998.

SCHANLER, R.J. Suitability of human milk for the low birth weight infant. Clinics Perinatology, Philadelphia, v.22, n.2, p.207-222, 1995.

SCHANLER, R.J.; OH, W. Composition of breast milk obtained from mothers of premature infants as compared to breast milk obtained from donors. J. Pediatr., St. Louis, v.96, n.5, p.679-81, 1980.

SCHANLER, R.J.; GARZA C.; NICHOLAS, B.L. Fortified mother's milk for very low birth weight infants: results of growth and nutrient balance studies. J. Pediatr., St. Louis, v.107, n.4, p.437-445, 1985.

SCHANLER, R.J.; GARZA C. Improved mineral balance in very low birth weight infants fed fortified human milk. J. Pediatr., St. Louis, v.112, n.4, p. 452-456, 1987.

SCHANLER, R.J. The use of human milk for premature infants. Pediatric Clinics North Am., Houston, v. 2001, n.1, p. 207-219, 2001.

SCHMIDL, M.K.; TAYLOR, S.L.; NORDLEE, J. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. Food Technology, Chicago, v.48, n.10, p.77-85, 1994.

SILVA, P.H.F. et al. Físico-Química do Leite e Derivados – Métodos Analíticos. Juiz de Fora: MG Oficina de Impressão Gráfica e editora Ltda, 1997.

SIMONIN, C.; RUEAG, M.; SIDEROPULOS, D. Composition of fat content and fat globule size distribution of breast milk from mothers delivering term and preterm. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v.40, n.4, p.860-866, 1984.

TOMA, S. Tereza. Instituto de Saúde/IBFAN Brasil. Norma Brasileira para Comercialização de Alimentos para Lactentes - Avanços e Retrocessos. Disponível em: <http://www.aleitamento.org.br>. Consulta março de 2000.

TOSSAVAINEN, O. et al. Removal of β -lactoglobulin residues from an enzymatic whey protein hydrolysate. Milchwissenschaft, [S.l.], v.51, n.11, p.628-632, 1996.

TRIEBOLD, H.O.; AURAND, L.W. Food composition and analysis. New York: D. Van Nostrand Company. 1963. p.348 – 350

VALDÉS, V. et al. Manejo Clínico da Lactação - Assistência à Nutriz e ao Lactente. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 1996. 128p. p.29-90

VENKTARAMAN, P.S.; BLICK, K.E. Effect of mineral supplementation of human milk on bone mineral content and trace element metabolism. J. Pediatr., St. Louis, v. 113, n.2, 1988.

VAN WILLIGE, R.W.G.; FITZERALD, R.J. Tryptic and chymotryptic of beta-lactoglobulin A, B and AB at ambient and high pressure. Milchwissenschaft, [S.l.], v.50, n.4, p.183-186, 1995.

VALENTINE, C.J.; HURST, N.M.; SCHANLER, R.J. Hindmilk improves weight gain in low-birth-weight infants fed human milk. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., Philadelphia, v.18, n.4, p.474-476, 1994.

VANDENPLAS, Y.; HAUSER, B., BLECKER, U. et al. The Nutritional Value of a Whey Hidrolysate Formula Compared with a Whey-Predominant Formula in Healthy Infants. J. Pediatric. Gastr. Nutr. New York, v. 17, n. 1, p. 92-96, 1993.

WARNER J.T.; LINTON, H.R.; DUNSTAN, F.D.; CARTLIDGE, P.T. Grow and metabolic responses in preterm infants fed fortified human milk or a preterm formula. Int. J. Clin Pract, Cardiff, UK, v.52, n.4, p.236-240, 1998.

WAUBEN, I.P. et al. Moderate nutrientt supplementation of mother's milk for preterm infants supports adequate bone mass and short-term growth: a randomizes, controlled trial. Am. J. Clin. Nutr, Bethesda, v.67, n.3, p. 465-472, 1998.

WIT, J.N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products., J. Dairy Sci, [S.L], v. 81, n.3, p. 597608, 1998.

WORTHINGTON-ROBERTS, B.S. Human milk composition and infant growth and development. In: WORTHINGTON-ROBERTS. 5.ed. St. Louis: Mosby, 1993. 485p. p.347-401

WILLS, M.E. et al. Short-term low temperature pasteurisation of human milk. Early Human Development, London, v.7, n.1, p.71-80, 1982.

ZIEGLER, E.E.; BIGA R.L., FOMON S.J. Nutritional Requerimetns of premature intans. In: Suskind R.M.. Textbook of Pediatric Nutrition, New York, Raven Press, 1981, p. 29-31.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – METODOLOGIA DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS	113
APÊNDICE 2 - ANÁLISE GRÁFICA PARA VERIFICAÇÃO DOS PRESSUPOSTOS DA ANOVA.....	120
APÊNDICE 3 - TESTE DE BARTLETT'S PARA VERIFICAÇÃO DA HOMOCEASTICIDADE.....	121
APÊNDICE 4 - ANÁLISE GRÁFICA PARA VERIFICAÇÃO DOS PRESSUPOSTOS DA ANOVA.....	122
APÊNDICE 5 - TESTE DE HARTLEY E LILLIEFORS.....	123
APÊNDICE 6 - TESTES DE KRUSKAL-WALLIS.....	124

APÊNDICE 1 – METODOLOGIA DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Estatísticas Descritivas

Foi efetuada uma análise descritiva, com o propósito de deixar claro o comportamento dos dados em relação à assimetria, dispersão e localização. Utilizou-se para a análise o gráfico do Box-Plot e Tabelas descritivas apresentando os resultados.

Delineamento Completamente Casualizado (DCC)

É o delineamento mais simples, uma vez que considera apenas os princípios da repetição e da casualização, deixando de lado o princípio do controle local. É bastante flexível, posto que o número de tratamentos e de repetições depende apenas do número de parcelas disponíveis, além de que o número de repetições pode variar de um tratamento para outro. No caso em estudo, utilizou-se de um delineamento completamente casualizado, com quantidades diferentes para as diversas repetições, conforme se vê abaixo:

Tratamento 1 → Leite Maduro: 26 repetições para cada fator.

Tratamento 2 → Leite Colostro: 10 repetições para cada fator.

Tratamento 3 → Leite RNPT: 10 repetições para cada fator.

Variáveis ou Fatores de Interesse: lactose, proteínas, lipídios, calorias. Para cálcio, fósforo, magnésio, sódio, potássio e zinco foram utilizados valores simétricos de 10 amostras para cada tratamento.

Análise de Variância

É uma prova estatística cujo modelo especifica certas condições sobre os parâmetros da população de onde se extraíram as amostras para a pesquisa. Tem por finalidade comparar três ou mais tratamentos em relação aos fatores de interesse. Exige-se, porém, que suas pressuposições básicas não sejam violadas.

Para a análise de variância dos dados apresentados neste estudo, foram efetuados os seguintes cálculos:

a) Graus de Liberdade para cada variável de interesse

$$\text{do Total: } (\sum j - 1) = (n - 1) = (46 - 1) = 45$$

$$\text{do Tratamento: } (\sum i - 1) = (3 - 2) = 2$$

$$\text{do Resíduo: } (\sum j - 3) = (46 - 3) = 43$$

b) Somas de Quadrados, Quadrados Médios, $F_{\text{calculado}}$, obtidos pelas fórmulas abaixo:

O valor de C é:

$$C = \frac{\sum (y_{11} + \dots + y_{126} + y_{21} + \dots + y_{210} + y_{31} + \dots + y_{310})^2}{\sum j}$$

Soma de Quadrados do Total é:

$$SQT = ((y_{11}^2 + \dots + y_{126}^2 + y_{21}^2 + \dots + y_{210}^2 + y_{31}^2 + \dots + y_{310}^2) - C)$$

Soma dos Quadrados dos Tratamentos é:

$$SQT = ((\frac{\sum T_1^2}{26} + \frac{T_2^2}{10} + \frac{T_3^2}{10}) - C)$$

Soma de Quadrados dos Resíduos é:

$$SQR = (SQT - SQTr)$$

O p-valor foi obtido computacionalmente, especificando-se $\alpha=0,05$ na regra de decisão, para concluir sobre os testes de hipóteses da Análise de Variância.

TABELA - ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q	Q. M.	F_0	p-Valor
Tratamentos	$(\sum i - 1) = 2$	SQTr	SQTr/2	SQTr/SQR	Obtido computac.
Resíduos	$(\sum j - 3) = 43$	SQR	SQR/43		
Total	$(\sum j - 1) = 45$	SQT			

Para cada variável de interesse, foram testadas as seguintes hipóteses:

H_0 = Hipótese nula e H_1 = Hipótese alternativa.

H_0 : As médias dos tratamentos não diferem entre si.

H_1 : Pelo menos uma das médias dos tratamentos difere.

e

H_0 : Os tratamentos não diferem entre si.

H_1 : Pelo menos um tratamento difere.

Como regra de decisão, rejeitou-se H_0 quando se obteve um p-valor abaixo do nível de significância estabelecido ($\alpha = 0,05$); e concluiu-se em favor de H_1 .

Pressuposição de Análise de Variância.

A análise de variância é aceita como resposta na verificação de haver ou não diferenças significativas entre os tratamentos, quando da não violação dos pressupostos abaixo:

Os efeitos principais devem ser aditivos \rightarrow Modelo: $y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$

Os erros devem ser independentes $\rightarrow Cov(e_{ij}, e_{ij}) = 0$

Os erros devem ter a mesma variabilidade \rightarrow Homocedasticidade.

Os erros devem ser normalmente distribuídos $\rightarrow e_{ij} \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma^2)$

A verificação dos pressupostos será feita da seguinte maneira:

a) independência: através do gráfico de Resíduos x Preditos;

b) homocedasticidade: através do gráfico de Resíduos x Fatores e dos testes de Bartlet (n's diferentes) e Hartley (n's iguais);

c) normalidade: através do gráfico de normalidade e do teste de Lilliefors e teste de Kruskal-Wallis.

Teste de Bartlet's para Homocedasticidade.

Possui a vantagem de não requerer que os n_i 's sejam iguais, isto é, permite verificar homogeneidade de variância para tratamentos com números de repetições diferentes.

O Teste de Bartlet's possui a seguinte fórmula:

$$U = \frac{1}{C} \left[v \log_e (\hat{\sigma}^2) - \sum_t v_t \log_e \hat{\sigma}_t^2 \right]. \text{ Onde } v_t = n_i - 1, v = \sum v_t,$$

$$\hat{\sigma}^2 = \sum \frac{v_t \hat{\sigma}_t^2}{v}, \quad e \quad C = 1 + \frac{1}{3(t-1)} \left(\sum \frac{1}{v_t} - \frac{1}{v} \right).$$

Foram testadas as seguintes hipóteses:

H₀: Há homogeneidade de variância entre os tipos de leite humano.

H₁: Não há homogeneidade de variância entre os tipos de leite humano.

Como regra de Decisão:

Rejeitou-se: H₀ se $U > \chi^2_{(\alpha, t-1)}$.

Teste de Hartley para Homocedasticidade

É um teste indicado para verificar igualdade de variâncias, quando os tratamentos possuem o mesmo número de repetições.

Estatística do teste:

$H_c = \frac{s^2 \max}{s^2 \min}$. Onde $s^2 \max$ ($s^2 \min$) é o maior (menor) valor encontrado para variância estimada entre os tratamentos.

a) Hipóteses testadas:

H₀: há homocedasticidade

H₁: não há homocedasticidade

b) Regra de decisão:

Rejeita-se H₀ se $H_c > H_{(g; r-1)\alpha}$ tabelado, onde g = número de tratamentos e r = número de repetições

Teste Lillifors para Normalidade.

O teste não paramétrico de Lilliefors é utilizado para verificar a aproximação da normalidade, quando a média e a variância populacional não são conhecidas, mas apenas estimadas pela amostra. Na verdade, a aceitação de H_0 não significa que a distribuição padrão seja normal; indica tão somente tratar-se de uma razoável aproximação da distribuição desconhecida.

Permite a verificação de normalidade de resíduos entre os tipos de leite humano, e consiste em obter-se o D supremo ou D máximo, numa análise de resíduos. Sua fórmula é a seguinte:

Estatística D:

$$D = \text{Sup}[F(Z_i) - S(Z_i)] \quad \text{ou} \quad D = \text{Sup}[F(Z_i) - S(Z_{i-1})],$$

onde:

$F(Z_i)$ são as probabilidades da variável normal reduzida

$Z_i = e_{ij}/s$, em que s é a estimativa do desvio padrão dos resíduos

$S(Z_i) = k/n$ (distribuição empírica), $K = n^\circ$ de observações $<$ ou $=$ aos erros (e_{ij}) e n é o tamanho da amostra.

Foram testadas as seguintes hipóteses:

H_0 : Não se pode afirmar que a variável não possui distribuição normal.

H_1 : Pode-se afirmar que a variável não possui distribuição normal.

Como Regra de Decisão, rejeita-se H_0 , sempre que se obtém um D supremo calculado maior que um D supremo tabelado. Ou quando o p-valor obtido na análise é inferior ao $\alpha=0,05$.

Teste de Kruskal-Wallis

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que se baseia na atribuição de postos a cada observação, testa a hipótese de que k amostras independentes provenham

da mesma população ou de populações idênticas com relação à média. É utilizado em substituição a ANOVA, nos casos em que um ou mais de seus pressupostos não sejam satisfeitos.

a) Estatística de teste:

$$H = \left(\frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1) \right) / \left(1 - \frac{\sum T}{N^3 - N} \right)$$

onde: k = número de amostras, n_j = número de casos na amostra j , N = número total de casos, R_j = soma de postos na amostra j e $T = t^3 - t$ (t = número de observações empatadas em um grupo de escores empatados).

Quando não houver observações empatadas, a estatística H é calculada sem o denominador:

a) Hipóteses testadas:

H_0 : não há diferença entre os tratamentos

H_1 : há diferença entre pelo menos um dos tratamentos

b) Regra de Decisão:

Rejeita-se H_0 se H apresenta valor, com $k-1$ graus de liberdade, cuja probabilidade é maior que o nível α previamente especificado.

Teste de Comparações Múltiplas:

São testes complementares às análises da Tabela de ANOVA e da prova de Kruskal-Wallis para o caso da rejeição, em ambos, da hipótese nula de igualdade, pois verificam que entre pares de tratamentos existe diferença significativa.

Diferença Mínima Significativa para Kruskal-Wallis:

Determinam-se as diferenças em módulo da soma, dois a dois, dos postos dos tratamentos $|R_i - R_j|$ e então se calcula a $d.m.s. = Q \sqrt{\frac{N(N+1)}{12}}$, sendo Q um valor tabelado.

Haverá diferença significativa para todos os pares de postos cuja diferença em módulo for superior ao valor da *d.m.s.*

Teste de Tukey

Destina-se a avaliar qualquer contraste entre duas médias. Baseia-se nas diferenças mínimas significativas e possui a fórmula:

$$d.m.s. = q \sqrt{\left(\frac{1}{r_i} + \frac{1}{r_j}\right) \frac{QMR}{2}}$$

Onde:

$$\left(\frac{1}{r_i} + \frac{1}{r_j}\right) \text{ é o n}^\circ \text{ de repetições de cada um dos tratamentos}$$

q: é obtido em tabela através do n° de tratamentos e graus de liberdade dos resíduos

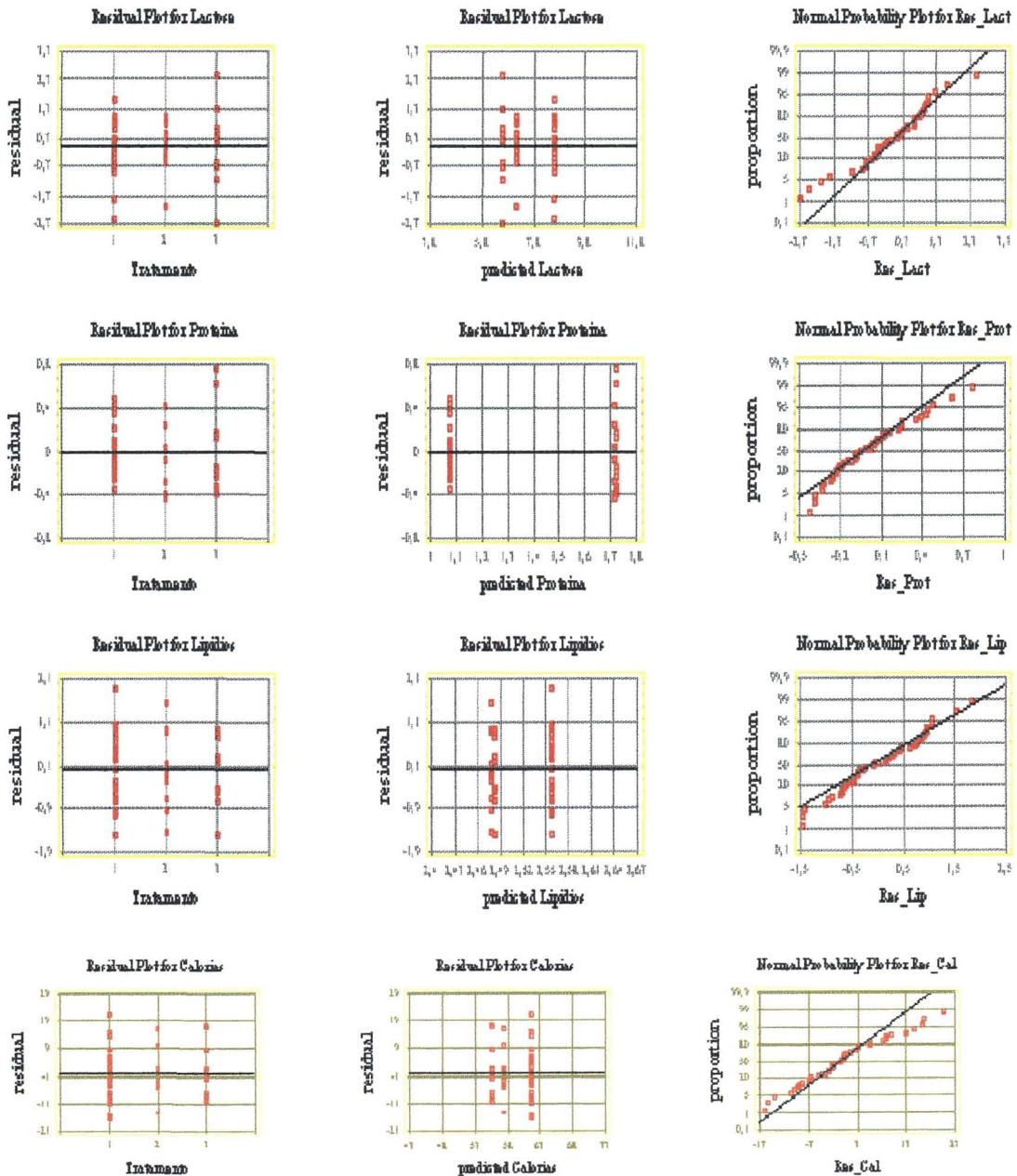
QMR: é o Quadrado Médio dos Resíduos

Coefficiente de variação

Trata-se de uma medida relativa de dispersão, útil para a comparação em termos relativos do grau de concentração em torno da média de séries distintas. Tem a seguinte fórmula:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

APÊNDICE 2 - ANÁLISE GRÁFICA PARA VERIFICAÇÃO DOS PRESSUPOSTOS DA ANOVA



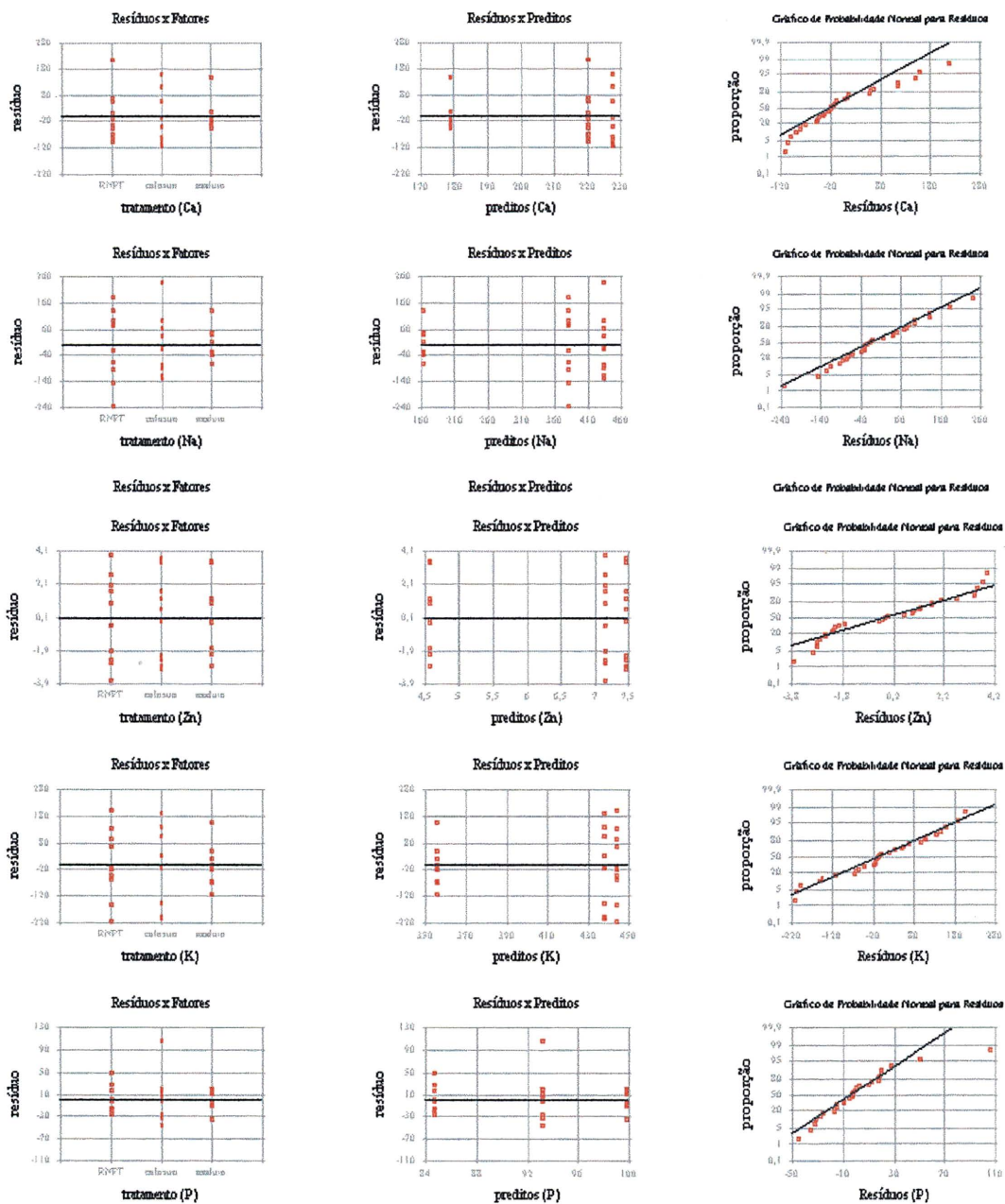
APÊNDICE 3 - TESTE DE BARTLETT'S PARA VERIFICAÇÃO DA HOMOCEASTICIDADE

	Estadística de Bartlett's	P-Value
Res_LACTOSE	1,0688	0,252671
Res_PROTEÍNA	1,1334	0,075061
Res_LIPÍDIOS	1,00782	0,851288
Res_CALORIAS	1,00395	0,921778

Teste de Lilliefors para verificação Normalidade.

	N	Max D	P
RES_LACTOSE	46	0,093727	p > 0,20
RES_PROTEÍNA	46	0,091066	p > 0,20
RES_LIPÍDIOS	46	0,105006	p > 0,20
RES_CALORIAS	46	0,11153	P < 0,20

APÊNDICE 4 - ANÁLISE GRÁFICA PARA VERIFICAÇÃO DOS PRESSUPOSTOS DA ANOVA



APÊNDICE 5 - TESTE DE HARTLEY E LILLIEFORS

	Hartley - Homocedasticidade			Lilliefors - Normalidade		
	H tab 5%	H calc	Conclusão	D tab 5%	D calc	Conclusão
Ca	5,34	3,394	Não rejeita	0,161	0,169	Rejeita
Mg	5,34	6,822	Rejeita	0,161	0,169	Rejeita
K	5,34	3,595	Não rejeita	0,161	0,075	Não rejeita
Na	5,34	5,076	Não rejeita	0,161	0,115	Não rejeita
Zn	5,34	1,330	Não rejeita	0,161	0,165	Rejeita
P	5,34	6,302	Rejeita	0,161	0,150	Não rejeita

APÊNDICE 6 - TESTES DE KRUSKAL-WALLIS

Postos para Ca					
COLOSTRO	POSTO	MADURO	POSTO	RNPT	POSTO
115,55	1	130,29	4	120,38	2,5
120,38	2,5	146,98	8	138,74	5,5
138,74	5,5	154,45	10	149,95	9
145,25	7	156,36	11	173,88	15
184,54	16,5	158,72	12	184,54	16,5
220,13	21	159,62	13	205,12	20
283,07	24	166,59	14	227,99	22
340,74	27	192,45	18	278,08	23
341,16	28	195,37	19	285,58	25
385,66	29	327,03	26	436,06	30
Total	161,5		135		168,5

Postos para Zn					
COLOSTRO	POSTO	MADURO	POSTO	RNPT	POSTO
4,45	7,5	1,75	1	3,44	5
4,65	10,5	2,41	2	4,45	7,5
5,00	12	2,48	3	4,65	10,5
5,24	13,5	2,84	4	5,24	13,5
7,32	18	4,32	6	6,76	17
8,07	20	4,50	9	8,13	22
8,67	23	5,50	15	8,84	24
9,16	25	5,81	16	9,22	26
10,87	28	7,95	19	9,84	27
11,15	30	8,08	21	11,02	29
Total	187,5		96		181,5

Postos para Mg					
COLOSTRO	POSTO	MADURO	POSTO	RNPT	POSTO
22,47	12,5	14,49	1	16,56	2
23,21	14,5	17,49	3	18,39	4
23,58	17	18,98	5	20,30	7
24,33	20	19,62	6	20,76	9
24,51	21	20,63	8	21,77	10
24,52	22,5	22,04	11	22,47	12,5
25,02	24	23,91	18	23,21	14,5
25,20	26	25,17	25	23,53	16
25,46	27	26,09	28	24,12	19
45,39	30	26,36	29	24,52	22,5
total	214,5		134		116,5

Tabela de postos para P						
COLOSTRO	POSTO	MADURO	POSTO	RNPT	POSTO	
47,78	1	64,23	5	58,80	2	
60,21	3	90,03	13	67,24	7	
61,06	4	90,52	14	67,32	8	
65,16	6	94,67	17	69,79	9	
91,48	15	96,37	19	69,95	10	
92,87	16	96,42	20	81,05	11	
95,75	18	109,89	23	83,96	12	
105,61	22	117,48	26	102,14	21	
112,44	25	118,33	27	111,64	24	
198,80	30	119,52	28	134,99	29	
total	140		192		133	