



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

EFEITOS DA PASTEURIZAÇÃO E DO CONGELAMENTO
SOBRE A FRAÇÃO LIPÍDICA DO LEITE HUMANO

LUIZ ANTÔNIO BORGÓ

Brasília-DF

Abril/2011



**Universidade de Brasília
Faculdade de Ciência da Saúde**

Pós-graduação em Ciências da Saúde

**EFEITOS DA PASTEURIZAÇÃO E DO CONGELAMENTO SOBRE A
FRAÇÃO LIPÍDICA DO LEITE HUMANO**

LUIZ ANTÔNIO BORGÓ

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Profª Drª Wilma Maria Coelho Araújo

**Brasília-DF
2011**

Luiz Antônio Borgo

**EFEITOS DA PASTEURIZAÇÃO E DO CONGELAMENTO SOBRE A
FRAÇÃO LIPÍDICA DO LEITE HUMANO**

**Tese apresentada como requisito
parcial para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília.**

Aprovado em 15 de abril de 2011.

Banca Examinadora

Wilma Maria Coelho Araújo, Doutor
Professor Orientador
Universidade de Brasília

Maria Célia Lopes Torres, Doutor
Professor examinador
Universidade Federal de Goiás

Maria Hosana Conceição, Doutor
Professor examinador
Universidade de Brasília

Inês Sabioni Resck, Doutor
Professor examinador
Universidade de Brasília

Teresa Helena Macedo da Costa, Doutor
Professor examinador
Universidade de Brasília

Dirce Bellezi Guilhem, Doutor
Professor examinador (suplente)
Universidade de Brasília

Borgo, Luiz Antônio

Efeitos da pasteurização e do congelamento sobre a fração lipídica do leite humano/Luiz Antônio Borgo /Tese de doutorado/ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2010.

Área de Concentração: Saúde Coletiva

Orientador: Prof^a Dr^a Wilma Maria Coelho Araújo

1.Leite humano 2.Lipídios 3.Pasteurização 4.Ácidos graxos 5.Congelamento

AGRADECIMENTOS

Ao Pai de todos nós, por permitir nossa existência.

À minha família, por acreditar na minha vontade e capacidade de realizar meus sonhos e por suportar meus momentos de “crise”.

À professora Dra. Wilma Maria Araújo Coelho, minha orientadora, pela ajuda, paciência, insistência durante a realização deste trabalho e, principalmente, pela amizade.

Ao professor Hugo Clemente, por ter aberto as portas do laboratório de química orgânica do Instituto de Química permitindo-me usá-lo incondicionalmente.

Às professoras Dra. Inês Sabioni Resck e Dra. Maria Hosana Conceição, pela disponibilidade de equipamentos e imensa ajuda em todas as etapas deste trabalho. Agradeço muitíssimo suas contribuições.

Às professoras Dra. Maria Célia Lopes Torres, Dra. Teresa Helena Macedo da Costa e Dra. Dirce Bellezi Guilhem, por gentilmente aceitarem participar da banca de defesa.

À professora Dra. Connie M. Pimentel, pela amizade, incentivo e colaboração nas análises estatísticas.

À minha amiga e colega de trabalho Andréia Alves Rosa-Campos, pelo incentivo, força e, principalmente, insistente teimosia...no bom sentido!

Ao meu amigo e colega de trabalho, Márcio Antônio Mendonça, pela ajuda durante as etapas laboratoriais, a quem devo justa e merecida gratidão. Muito obrigado!

Aos meus colegas da FAV que, durante muito tempo, “pressionaram-me”...valeu à pena tanta insistência!

À funcionária do Banco de Leite Humano do HUB/UnB, Helen Márcia de Sousa, pela colaboração no processamento da amostra doada a este trabalho.

Enfim, a todos que de alguma forma participaram, direta ou indiretamente, para que um sonho se realizasse. OBRIGADO!

“The greatest enemy of knowledge is not ignorance...it is the illusion of knowledge.”

(Stephen Hawking)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Aspectos químicos e nutricionais dos lipídios.....	3
2.2. Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados.....	8
2.2.1. Auto-oxidação de lipídios.....	10
2.2.2. Oxidação fotossensibilizada.....	13
2.2.3. Oxidação enzimática.....	13
2.3. Ácidos graxos essenciais: conceito, importância, fontes, leite humano.....	14
2.4. Aspectos químicos e nutricionais da fração lipídica em leite humano.....	17
2.5. Ácidos graxos <i>trans</i>	23
2.6. Bancos de leite humano (BLH's).....	30
2.6.1. Beneficiamento e controle de qualidade em bancos de leite humano....	32
3. HIPÓTESE.....	35
4. OBJETIVOS.....	35
4.1. Objetivo Geral.....	35
4.2. Objetivos Específicos.....	35
5. METODOLOGIA.....	36
5.1. Pesquisa.....	36
5.2. Amostragem.....	36
5.3. Determinações analíticas.....	37
5.3.1. Extração de lipídios totais e esterificação (metilação) dos ácidos graxos.....	37

5.3.2. Análise cromatográfica.....	40
5.3.3. Análise por espectroscopia no infravermelho (IV).....	42
5.3.4. Análise por ressonância magnética nuclear (RMN).....	45
5.3.5. Análise estatística.....	48
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
6.1. Análises cromatográficas.....	49
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
7.1. Cromatografia gasosa.....	51
7.1.1. Ácidos graxos saturados.....	51
7.1.2. Ácidos graxos insaturados.....	53
7.2. Dados espectroscópicos de IV.....	61
7.3. Dados espectroscópicos de RMN ¹ H.....	62
8. CONCLUSÕES.....	64
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
10. REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICE A: Curvas de calibração dos ácidos graxos analisados.....	91
APÊNDICE B: Cromatograma das amostras de leite humano.....	93
APÊNDICE C: Infravermelho das amostras de leite humano.....	94
APÊNDICE D: RMN das amostras de leite humano.....	109
APÊNDICE E: Infravermelho das amostras de leite humano.....	110
APÊNDICE F: RMN ¹ H das amostras de leite humano.....	115
ANEXO A: Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética.....	125

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Algumas fontes de ácido α -linolênico (AAL), ácidos eicosapentenoico (EPA) e docosahexenoico (DHA).....	5
TABELA 2. Composição aproximada (% peso) dos leites bovino, humano, de cabra e de ovelha.....	18
TABELA 3. Composição em ácidos graxos dos leites bovino e humano em g/100g de gordura.....	19
TABELA 4. Concentração de ácidos graxos saturados nas amostras de leite humano, para os tratamentos LC, T0, T90, T120, T150, T180, T210, T240.....	51
TABELA 5. Concentração de ácidos graxos insaturados nas amostras de leite humano, para os tratamentos LC, T0, T90, T120, T150, T180, T210, T240.....	54
TABELA 6. Propriedades físicas de ácidos graxos saturados.....	58
TABELA 7. Propriedades físicas de ácidos graxos insaturados.....	59
TABELA 8. Bandas de absorção observadas no IV para ácidos graxos saturados e suas atribuições.....	61
TABELA 9. Bandas de absorção observadas no IV para ácidos graxos insaturados e suas atribuições.....	61
TABELA 10. Deslocamentos químicos de RMN ^1H dos ácidos graxos saturados.....	62
TABELA 11. Deslocamentos químicos de RMN ^1H dos ácidos graxos insaturados.....	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. As famílias dos ácidos graxos poli-insaturados.....	7
FIGURA 2. Etapas do mecanismo de auto-oxidação de lipídios.....	12
FIGURA 3. Mecanismo da oxidação fotossensibilizada.....	13
FIGURA 4. Mecanismo da oxidação enzimática.....	13
FIGURA 5. Vias paralelas do metabolismo de AGPI.....	15
FIGURA 6. Estruturas dos ácidos graxos oleico (C18:1, 9c; PF 13°C-14°C) e elaídico (C18:1, 9t; 44°C).....	24
FIGURA 7. Hidrogenação catalítica com formação de duplas ligações <i>cis/trans</i>	26
FIGURA 8. Componentes básicos de um cromatógrafo gasoso.....	41
FIGURA 9. Parte do espectro eletromagnético de radiações.....	43
FIGURA 10. Esquema de um equipamento de espectroscopia IV.....	44
FIGURA 11. Tipos de vibrações moleculares.....	45
FIGURA 12. Geração de dipolo magnético por uma carga nuclear.....	47
FIGURA 13. Direções dos spins submetidos a um campo magnético β_0	47
FIGURA 14. Regressões dos ácidos cáprico e araquídico.....	52
FIGURA 15. Regressões dos ácidos esteárico, mirístico e láurico.....	52
FIGURA 16. Regressão do ácido palmítico.....	52
FIGURA 17. Regressão dos ácidos oleico e ZZ-linoleico.....	54
FIGURA 18. Regressão dos ácidos palmitoleico; ZE-linoleico e linolênico..	55
FIGURA 19. Primeiros dois componentes principais para ácidos graxos em leite humano.....	60
FIGURA 20. Integrações das áreas correspondentes ao oleato de metila	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AAL	Ácido α -linolênico
AAR	Ácido araquidônico
AG	Ácido graxo
AGCL	Ácido graxo de cadeia longa
AGE	Ácido graxo essencial
AGL	Ácido graxo livre
AGPCL	Ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGT	Ácido graxo <i>trans</i>
AL	Ácido linoleico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Ácido palmítico
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
BLH	Banco de Leite Humano
CG	Cromatografia gasosa
CLA	Ácido linoleico conjugado
DHA	Ácido docosahexenoico
DIC	Detector de ionização de chama
DPA	Ácido docosapentenoico
EPA	Ácido eicosapentenoico
FAV	Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
FDA	Food and Drug Administration
FE	Fase estacionária
FID	<i>Free induction decay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FM	Fase móvel

HDL	Lipoproteína de alta densidade
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IFF	Instituto Fernandes Figueira
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IV	Infravermelho
IQ-UnB	Instituto de Química da Universidade de Brasília
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Leite humano
LPL	Lipase lipoproteica
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PG ₂	Prostaglandina 2
PG ₃	Prostaglandina 3
ppm	Parte por milhão
TG	Triglicerídeo
QI	Quociente de inteligência
R	Coeficiente de correlação
r ²	Coeficiente de determinação
RF	Radiofrequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
UnB	Universidade de Brasília
ZE-linoleico	Ácido linoleico <i>trans</i>
ZZ-linoleico	Ácido linoleico <i>cis</i>

RESUMO

A amamentação e o leite humano têm papel fundamental no desenvolvimento de lactentes, especialmente daqueles entre zero e seis meses de idade. Do ponto de vista nutricional, o leite humano fornece os nutrientes necessários, em quantidade e qualidade, adequadas aos lactentes e, dentre eles, os lipídios têm papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso e na maturidade da acuidade visual, além de componentes energéticos e transportadores de vitaminas lipossolúveis. Nos bancos de leite humano, é prática corrente a pasteurização lenta do leite (63°C – 65°C/30minutos) com a finalidade de eliminar micro-organismos indesejáveis e posterior congelamento a –18°C por até seis meses. Isso possibilita manter disponíveis estoques do produto que serão usados para a alimentação, preferencialmente, de recém-nascidos pré-termo. O objetivo dessa pesquisa foi analisar, mensalmente, os efeitos da pasteurização e do armazenamento sob congelamento a –18°C por até oito meses sobre a fração lipídica do leite humano. Para isso, amostras de leite de doadora única foram retiradas na seguinte ordem: leite cru, leite após a pasteurização e leite após congelamento a –18°C por 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 dias, e passaram a ser identificadas na seguinte ordem: LC, T0, T30, T60, T90, T120, T150, T180, 210 e T240. Após extração da gordura e esterificação, as amostras dos ácidos graxos metilados foram analisadas em cromatógrafo a gás com detector DIC e injetor *split/splitless*. Para a separação dos ácidos graxos, usou-se a coluna capilar de sílica fundida SPTM-2380 (30m x 0,25mm x 0,2µm), marca Supelco. Os resultados mostraram grande variação na concentração de ácidos graxos para mais e para menos, de um mês para o outro, demonstrando que a falta de homogeneização (agitação) durante o processo de pasteurização e após o descongelamento contribuiu para a ascensão das moléculas de gordura e/ou sua retenção nas paredes do recipiente de vidro. Do mesmo modo, ácidos graxos livres, possivelmente liberados por lipases microbianas, podem ter-se incorporados à gordura sobrenadante. A falta de homogeneidade do leite pode ser considerada um problema relevante quando da sua distribuição a recém-nascidos pré-termo, haja vista que nem todos receberiam lipídios na quantidade suficiente para suprir suas necessidades nutricionais, podendo acarretar moléstias carenciais.

Palavras chave: Leite humano; lipídios; pasteurização; ácidos graxos; congelamento.

ABSTRACT

Breastfeeding and human milk play vital roles in the development of infants, especially those between zero and six months of age. From a nutritional standpoint, human milk provides the nutrients needed in quantity and quality, suitable for infants. Lipids play a fundamental role in nervous system development and maturity of visual acuity, as well as serve as energy components and transport fat-soluble vitamins. In human milk banks, the pasteurization of milk (63°C-65°C/30min) is normal practice to eliminate undesirable micro-organisms and subsequent freezing at - 18°C for up to six months. This facilitates the maintenance and control of available inventory of the product that will be used preferably as food for newborn preterm infants. The objective of this research was to analyze monthly the effects of pasteurization and storage under freezing at - 18° C for up to eight months on the lipid fraction of human milk. For this, samples of milk from a single donor were collected: raw milk, after pasteurization and milk after freezing at -18°C for 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 days, identified as: LC, T0, T30, T60, T90, T120, T150, T180, T210 and T240 respectively. After extraction and esterification of fat, the samples of fatty acid methyl esters were analyzed using a gas chromatograph with FID detector and split / splitless injector. For the separation of fatty acids, the fused silica capillary column SPTM-2380 (30m x 0.25 mm x 0.2 mm), Supelco brand was used. The results showed a wide variation in the concentration of fatty acids from one month to another, demonstrating that the lack of homogenization (shaking) during the pasteurization process and after thawing contributed to the rise of the fat molecules and / or their retention on the walls of the glass container. Similarly, free fatty acids, probably released by microbial lipases, may have been incorporated into the supernatant fat. The lack of homogeneity of the milk can be considered a significant problem when it was distributed to newborn preterm babies, given that not all receive lipids in sufficient quantity to meet their nutritional needs, which may cause deficiency diseases.

Key words: Human milk, lipids, pasteurization, fatty acids, freezing.

1. INTRODUÇÃO

Vários estudos demonstram as vantagens da amamentação e do leite humano para a saúde de lactentes¹, principalmente daqueles entre zero e seis meses de idade (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Outros estudos destacam os benefícios oriundos da presença de anticorpos (imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), proteínas e células imunológicas que ajudam a prevenir a entrada de microorganismos nos tecidos do corpo e outros constituintes que inibem, direta ou indiretamente, a atividade microbiana (1, 10). Algumas pesquisas epidemiológicas mostram também que a amamentação diminui a incidência ou a gravidade de doenças como diarreia, bacteremia, meningite bacteriana, infecções respiratórias, otite média, botulismo, infecção urinária, enterocolite necrotizante e, ainda, que o leite humano tem ação contra a síndrome da morte súbita, *diabetes mellitus* insulino dependente, linfoma, retocolite ulcerativa, doenças alérgicas (3, 11).

Destaca-se também a importância da amamentação sob o aspecto nutricional, uma vez que o leite humano tem em sua composição os nutrientes necessários em quantidade e qualidade adequadas ao lactente. Entre os nutrientes, os lipídios, e especialmente os ácidos graxos essenciais, se sobressaem pelo papel fisiológico que exercem no desenvolvimento do sistema nervoso e na maturidade da acuidade visual, além de fornecerem energia e transportarem as vitaminas lipossolúveis (12, 13).

Regularmente, os bancos de leite humano (BLH) submetem o leite materno, proveniente de doadoras, à pasteurização seguida de armazenamento sob congelamento a -18°C por até seis meses para, desse modo, manter disponíveis os estoques desse produto nos hospitais materno-infantis. No entanto, o processo térmico provoca, em maior ou menor grau, alterações nos alimentos de acordo com a intensidade do binômio tempo/temperatura e da sua sensibilidade ao calor. Assim, moléculas de proteínas podem ser desnaturadas, enzimas inativadas, lipídios oxidados, vitaminas e pigmentos modificados. Dentre os macronutrientes presentes no leite, os lipídios são os que sofrem maior alteração durante o beneficiamento.

¹ Lactentes – crianças de zero a um ano de idade (14).

Lipídios são compostos orgânicos constituídos por ácidos graxos, saturados ou não, suscetíveis a vários tipos de reações químicas de natureza enzimática ou não. A oxidação é uma das principais reações e pode ocorrer na presença ou não de oxigênio e ser catalisada pela luz, calor, metais pesados, radicais livres, irradiação, podendo levar à formação de compostos tóxicos como os peróxidos. Em função dos processos térmicos, essas moléculas podem sofrer isomeria estrutural gerando ácidos graxos *trans*, que são sólidos à temperatura ambiente.

A Portaria n.º 322, de 26 de maio de 1988, do Ministério de Estado da Saúde, define BLH como “centro especializado obrigatoriamente vinculado a um hospital materno e/ou infantil, responsável pela promoção do incentivo ao aleitamento materno e execução das atividades de coleta, processamento e controle de qualidade de colostro, leite de transição e leite humano maduro, para posterior distribuição, sob prescrição do médico ou de nutricionista”. Entre outras atribuições, de acordo com esse documento, o BLH é responsável pela qualidade do leite que será fornecido aos lactentes (15).

Considerando que o processamento de qualquer alimento provoca perdas nutricionais e que no caso do leite pasteurizado e congelado essas perdas podem ocorrer em especial na fração lipídica, torna-se necessário investigar com maior profundidade os efeitos desses processos sobre tais constituintes com o objetivo de quantificar e interpretar as possíveis alterações decorrentes de sua manipulação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS QUÍMICOS E NUTRICIONAIS DOS LIPÍDIOS DO LEITE HUMANO

Quimicamente, os lipídios alimentares são essencialmente ésteres de ácidos graxos com glicerol, podendo conter pequenas quantidades de outras frações lipídicas como fosfolipídios, colesterol, esqualeno, lanosterol, ácidos graxos livres e, ainda, outros compostos ligados, como aldeídos, éteres de glicerol e compostos cetônicos (16).

Os ácidos graxos são, todos, monocarboxílicos, alifáticos (cadeia aberta), saturados ou insaturados. Neste último caso, podem apresentar uma ou várias insaturações e isomeria geométrica *cis*, como em todas as gorduras dietéticas, ou *trans*, comum no leite e carne de ruminantes e em gorduras parcialmente hidrogenadas. São solúveis em solventes orgânicos não polares, característica resultante da sua fração apolar (cadeia hidrocarbonada).

A denominação dos ácidos graxos segue, normalmente, a nomenclatura clássica da química orgânica; o carbono 1 é aquele que faz parte do grupo funcional (grupamento carboxila). Para o ácido palmítico, a nomenclatura é 16:0; para o oleico, 18:1 e para o linoleico, 18:2. Nessa nomenclatura, 16 e 18 se referem ao número de átomos de carbono na cadeia; 0, 1 e 2 indicam, respectivamente, o número de ligações duplas em cada caso. Assim, a posição da ligação dupla é dada pelo número indicado entre parênteses, a partir da função orgânica: 18:1(9), 18:2(9,12).

Na década de 80, do século passado, observaram-se novas inter-relações entre as estruturas e os efeitos biológicos dos ácidos graxos de modo que, do ponto de vista bioquímico, era mais importante notar o que ocorria proximamente ao grupo final da cadeia carbônica (grupamento metila) do que no grupo inicial (carboxila). Assim, surgiu a proposta de numeração dos carbonos da cadeia a partir do grupamento metila terminal, ou carbono ômega (ω), que representa a última letra do alfabeto grego. Portanto, se a primeira ligação dupla ocorresse entre os carbonos 3 e 4 (a partir de ômega) o composto seria um ω -3; se ocorresse entre os carbonos 6 e 7, um ω -6; se entre os carbonos 9 e 10, um ω -9 (17). Segundo Jensen et al., (18),

a letra *n* é preferível à ômega, que prevalece na literatura mais antiga. Desse modo, 18:2(9,12) torna-se 18:2 n-6.

Os lipídios são, entre os macronutrientes, os maiores fornecedores de energia na dieta, contribuindo também como reserva energética e para o fornecimento do ácido graxo linoleico (AL) e de vitaminas lipossolúveis. O AL é essencial e, no organismo, é transformado em ácido araquidônico (AAr), precursor de prostaglandinas (19). Do mesmo modo, o ácido graxo α -linolênico (AAL) também é considerado essencial para os humanos, que o usam para a síntese de outros ácidos graxos da família ômega-3 (n-3), incluindo os ácidos eicosapentenoico (EPA) e docosahexenoico (DHA).

No entanto, AL e AAL competem pelas mesmas enzimas (alongase e dessaturase) para a síntese de AAr, EPA e DHA. Uma vez que EPA e DHA são abundantes em certas espécies de peixes, são identificados como ácidos graxos ômega-3 derivados de produtos marinhos. Por outro lado, AAL é considerado um ácido graxo ômega-3-derivado de vegetais (20). A Tabela 1 mostra as principais fontes de AAL, EPA e DHA.

O leite humano, assim como o de outros mamíferos, é um fluido muito complexo no qual as moléculas de carboidratos e de alguns sais minerais estão em solução verdadeira; a caseína se encontra em uma fase dispersa, coloidal; as moléculas de lipídios, dos quais 98% são triacilgliceróis, em glóbulos emulsificados na fase aquosa.

A manutenção dessa emulsão se deve à formação de camadas bipolares de fosfolipídios, proteínas, mucopolissacarídeos, organizadas de modo a constituírem a membrana do glóbulo de gordura do leite, com área superficial suficientemente grande ($500\text{cm}^2/\text{mL}$) que permite a adesão de enzimas lipolíticas e de outros componentes. Os lipídios restantes são constituídos por fosfolipídios (0,8%), colesterol (0,5%), dentre outros (21).

Tabela 1 – Algumas fontes de ácido α -linolênico (AAL), ácidos eicosapentenoico (EPA) e docosahexenoico (DHA) (22)

Alimento	Porção	AAL (g)	EPA (g)	DHA (g)
Óleo de linhaça	(¹)	8,5	-	-
Linhaça	(¹)	2,2	-	-
Óleo de noz	(¹)	1,4	-	-
Óleo de canola	(¹)	1,2	-	-
Óleo de mostarda	(¹)	0,8	-	-
Óleo de soja	(¹)	0,9	-	-
Azeite de oliva	(¹)	0,1	-	-
Brócolis crus, em pedaços	(²)	0,1	-	-
Arenque cozido, Pacífico	(³)	-	1,06	0,75
Salmão cozido, Chinuque	(³)	-	0,86	0,62
Salmão cozido, Atlântico	(³)	-	0,28	0,95
Ostras cozidas, Pacífico	(³)	-	0,75	0,43
Truta cozida, arco-íris	(³)	-	0,40	0,44
Atum branco, em água	(³)	-	0,20	0,54
Caranguejo cozido	(³)	-	0,24	0,10
Camarão cozido	(³)	-	0,15	0,12
Bacalhau cozido, Pacífico	(³)	-	0,09	0,15
Óleo de savelha	(⁴)	-	0,13	0,09
Óleo de salmão	(⁴)	-	0,13	0,18

Porção: (¹) colher de sopa; (²) xícara; (³) 85g; (⁴) 1 grama. Valores Diários Recomendados: AAL (1,2-1,6g/dia, homens; 0,9-1,1g/dia, mulheres, ambos adultos); EPA (0,04-0,07g/dia, adultos); DHA (0,05-0,09g/dia, adultos).

A fração lipídica do leite humano fornece 50% a 60% de calorias (21, 23, 24). Além de energia, fornece ainda ácidos graxos poli-insaturados – incluindo os ácidos linoleico n-6 (18:2n-6) e o α -linolênico n-3 (18:3n-3), ambos essenciais, e seus derivados 20:4n-6, 20:5n-3, e 22:6n-3, esses últimos necessários à acuidade visual, ao desenvolvimento do sistema nervoso e ao funcionamento dos processos cerebrais.

Esses constituintes são também fontes de vitaminas lipossolúveis, contribuem para a formação das membranas celulares e são precursores de mensageiros químicos, conhecidos como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Esses

mensageiros controlam várias ações bioquímicas importantes como o crescimento e a divisão celular, a coagulação e a pressão sanguínea, as reações imunes e inflamatórias (17, 21, 25, 26, 27).

No leite humano, os triglicerídios respondem por 98% dos lipídios; exceção se faz às secreções pré-parto, que são constituídas principalmente por componentes das membranas, fosfolipídios, colesterol e colesterol éster, cujas concentrações diminuem pós-parto (9).

Apesar da capacidade que o corpo humano tem de regular o metabolismo lipídico, segundo Burr e Burr (28, 29), a exclusão de lipídios da dieta provoca moléstia carencial, o que caracteriza a essencialidade de alguns ácidos graxos que desempenham papel insubstituível no organismo.

A síntese de ácidos graxos insaturados ocorre a partir dos saturados por um processo enzimático catalisado por dessaturases, no fígado. No caso dos animais, que possuem apenas a dessaturase delta-9, somente são sintetizados o ácido oleico e sua família n-9. Desse modo, os ácidos graxos linoleico (18:2 n-6) e α -linolênico (18:3 n-3), que representam, respectivamente, as famílias n-6 e n-3, são considerados essenciais. A partir do n-3, por alongação e dessaturação (Figura 1), são sintetizados os ácidos eicosapentenoico (EPA, 20:5 n-3) e docosahexenoico (DHA, 22:6 n-3), necessários para a higidez das membranas biológicas, para a retina, córtex cerebral, tecido nervoso, testículos e plaquetas sanguíneas.

O ácido araquidônico é o metabólito mais importante do ácido linoleico nos tecidos animais, tanto do ponto de vista quantitativo quanto biológico. Geralmente, ele é o ácido graxo poli-insaturado mais abundante na fração de fosfolipídios e precursor de várias famílias de eicosanoides, como as prostaglandinas da série 2 (PG₂), tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas (mediadores anti-inflamatórios) (30, 31).

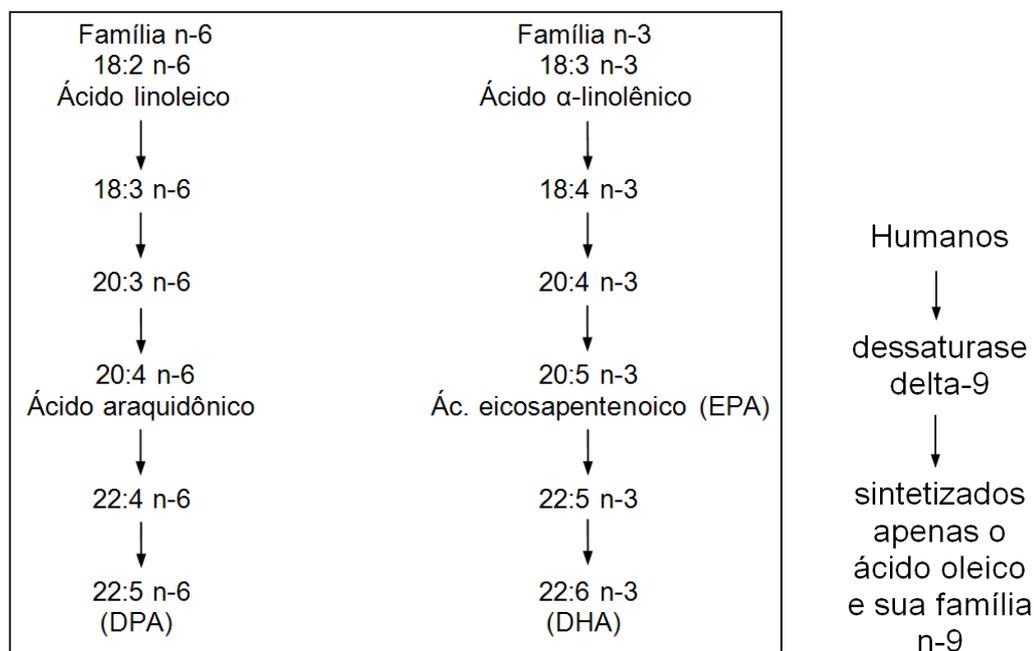


Figura 1 – As famílias dos ácidos graxos poli-insaturados (32)

O EPA é um dos mais importantes ácidos na família n-3. É um constituinte dos fosfolipídios nos tecidos animais, especialmente do cérebro, e é precursor da série PG_3 . De acordo com Christie (31), há grande interesse sobre o papel desse ácido nos distúrbios neurológicos, como a esquizofrenia.

O DHA é o produto final do metabolismo do AAL nos tecidos animais. Também é um constituinte dos fosfolipídios animais; neurônios e retina, particularmente, possuem alta concentração desse ácido. Sua concentração nos tecidos tem sido correlacionada com várias doenças; é essencial para muitas funções neurológicas e, juntamente com o colesterol, pode atuar como modulador da estrutura e função das membranas (31).

Segundo Belda e Pourchet-Campos (17), há evidências de que DHA e AAL incorporam-se ao tecido adiposo, sendo eliminados pela glândula mamária. Providencialmente, o leite humano é fonte de ácidos graxos n-3 e n-6; no entanto, sua concentração depende da quantidade ingerida pela mãe. Neste sentido, Jensen et al.,(33) afirmam que mães lactantes que recebem suplementação com DHA apresentam maiores concentrações desse ácido graxo tanto no leite quanto no

plasma; no entanto, ainda não está comprovado se esta suplementação traz algum benefício funcional para os lactentes alimentados ao seio.

No leite humano os lipídios se encontram numa estrutura globular e são sintetizados pelas células alveolares mamárias, estimuladas pelo esvaziamento do seio durante a amamentação e a secreção de prolactina no lóbulo anterior da pituitária (26).

Segundo Garton (16), Uauy (34) e Sarkar (35), a concentração de lipídios no leite humano é menor no colostro do que no leite maduro e o conteúdo lipídico do leite normal aumenta progressivamente durante a ordenha. Curiosamente, o colostro é mais rico em ácidos graxos insaturados que o leite, estando também presentes em maior concentração no colostro e no leite maduro de mães de crianças pré-termo. No entanto, a concentração de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa do leite humano diminui rapidamente depois de três meses após o parto (17).

Neste sentido, Gibson (36), em artigo sobre o papel dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPCL) na infância, afirma que há poucas pesquisas e por isso não se pode ainda confirmar a relação riscos/benefícios para a adição de ácido α -linolênico em fórmulas infantis. Por outro lado, há relatos suficientes que ratificam a segurança dos AGPCL em recém-nascidos a termo e pré-termo, embora sua eficácia não esteja tão bem esclarecida. Já os estudos com DHA indicam claramente a sua necessidade em recém-nascidos pré-termo para o desenvolvimento do sistema nervoso e a acuidade da visão.

2.2. ESTABILIDADE DOS ÁCIDOS GRAXOS (AG) POLI-INSATURADOS

Os métodos de preservação e conservação dos alimentos fundamentam-se em três princípios: (1) o princípio da prevenção ou retardamento da decomposição microbiana, que destaca as tecnologias relacionadas à manutenção dos alimentos livres de micro-organismos (assepsia), sua remoção, inibição do crescimento e da atividade e eliminação, caso estejam presentes; (2) o princípio da prevenção ou retardamento da autodecomposição, que se refere especialmente ao controle da atividade bioquímica decorrente da presença de enzimas e/ou à prevenção ou

retardamento de reações químicas; e (3) a prevenção das alterações ocasionadas por insetos, animais superiores, causas mecânicas (37, 38).

O calor é uma manifestação de energia de uso intenso na tecnologia de alimentos e pode ser o responsável por reações desejáveis ou indesejáveis, pelo surgimento de características sensoriais impróprias, e possibilita o aparecimento de componentes tóxicos provenientes do processamento. É, também, objeto de muitos estudos que avaliam e validam os processamentos térmicos, principalmente em componentes alimentares dotados de estrutura química suscetível a alterações térmicas, como os lipídios. Assim, o calor também é usado como processo de conservação de alimentos com o objetivo de aumentar sua vida de prateleira; nesse aspecto, sua principal função é eliminar micro-organismos patogênicos, deteriorantes e enzimas endógenas e microbianas. Ao contrário, a refrigeração e o congelamento, que também são processos de conservação, não têm a finalidade de inativar tais fatores de deterioração e sim inibir o crescimento de micro-organismos e a velocidade das reações química e enzimáticas.

No caso de lipídios, um dos principais fenômenos é a rancidez hidrolítica, que ocorre durante o processamento e o armazenamento de produtos gordurosos e pode ser de natureza química, autolítica ou microbiana (39).

A hidrólise química é catalisada pela luz e por traços de metais pesados e ocorre quando a gordura é rica em ácidos graxos com menos de 14 átomos de carbono.

A hidrólise enzimática (lipólise) é causada pela lipase e por outras enzimas lipolíticas. A lipólise também pode ocorrer pela presença de micro-organismos produtores de lipases, sobretudo fungos do gênero *Aspergillus*, como o *Aspergillus niger*, e por bactérias. As alterações devido à hidrólise enzimática podem ser acompanhadas pela medida da acidez titulável, uma vez que durante a lipólise ocorre a liberação de ácidos graxos que elevam a acidez do produto. Alguns ácidos graxos liberados possuem odor e sabor desagradáveis, o que caracteriza sua degradação. Por exemplo, as gorduras lácteas, por hidrólise, produzem o ácido butírico, um dos responsáveis pelo odor característico de sua degradação.

A ocorrência da rancidez hidrolítica leva a um aumento da rancidez oxidativa, uma vez que os ácidos graxos livres são mais suscetíveis à oxidação do que quando estão esterificados ao glicerol.

A rancidez – reação de deterioração de lipídios oxigênio-dependentes – já era mencionada na antiguidade como o maior problema para o armazenamento de óleos (principalmente de oliva) e tintas (sicativos), conforme LERAY (40).

Os primeiros estudos sobre oxidação lipídica datam de 1800, quando Nicolas-Theodore de Saussure, cientista suíço, observou, usando um manômetro de mercúrio, que uma fina camada de óleo de noz exposta ao ar era capaz de absorver cerca de 150 vezes o seu próprio volume em oxigênio, no intervalo de um ano. Paralelamente, o óleo tornava-se viscoso e com odor desagradável. Em 1928, Stephens (41) relatou o isolamento de peróxido a partir do mecanismo de auto-oxidação em ciclohexeno, um hidrocarboneto insaturado (42).

Óleos e gorduras são suscetíveis, em graus variados, a reações de degradação. Assim, quanto maior seu grau de insaturação maior a suscetibilidade a tais reações. Entre elas, a mais importante é a rancificação, que pode ter natureza hidrolítica ou oxidativa.

A rancidez oxidativa – mais importante à temperatura ambiente que a hidrolítica – pode ocorrer pelos processos auto-oxidativo (Figura 2), fotooxidativo (Figura 3) e enzimático (Figura 4). Esses mecanismos levam à formação de compostos que podem ser desejáveis (cor, odor, sabor) ou indesejáveis (compostos tóxicos, polímeros, compostos cíclicos), motivo pelo qual têm sido extensivamente estudados.

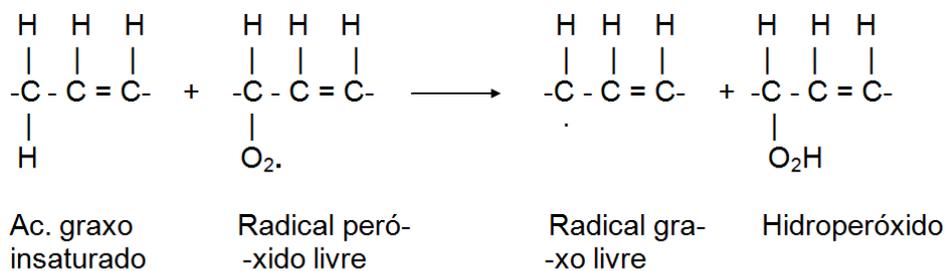
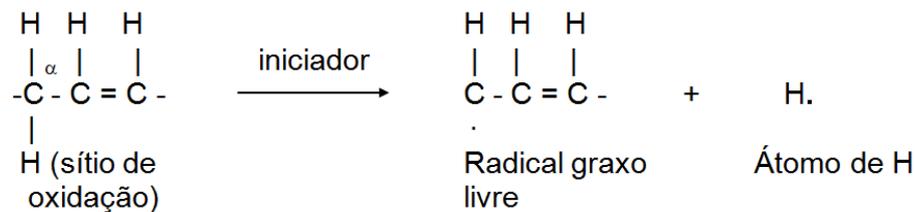
2.2.1. Auto-oxidação de lipídios

A auto-oxidação de lipídios insaturados é autocatalítica, ou seja, a velocidade da reação aumenta devido à formação de compostos que catalisam a própria reação. Requer a presença de oxigênio, envolve a formação de radicais livres e forma, como produto primário, hidroperóxidos, a partir dos quais são formados os produtos secundários (álcoois, aldeídos, cetonas) e os terciários (ácidos derivados

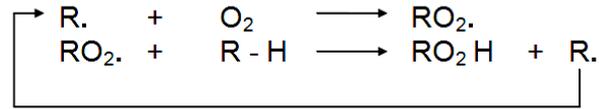
dos aldeídos). O processo é considerado indesejável, tanto do ponto de vista sensorial quanto de segurança do consumidor, uma vez que há formação de produtos altamente oxidados com possibilidade de produzir efeitos tóxicos. Ocorre, também, a perda de algumas vitaminas lipossolúveis e de caroteno. O mecanismo é inibido pelo uso de antioxidantes e por sequestradores de metais (19, 43, 44).

As fases desse mecanismo são mostradas abaixo:

Iniciação: fase na qual ocorre a formação de radicais graxos livres pela retirada de um hidrogênio do carbono alílico (α) por ação da luz, calor, metais ou de outros radicais livres:



Propagação: a formação de radicais peróxidos livres e de novos radicais graxos livres pode ser repetida em cadeia várias vezes, caracterizando a etapa de propagação.



Reação em cadeia

Os hidroperóxidos (RO₂H) formados na fase de propagação são os produtos primários da oxidação.

Terminação: ocorre quando os radicais livres reagem entre si, produzindo compostos inativos, não permitindo a continuidade da reação em cadeia (etapa da propagação).

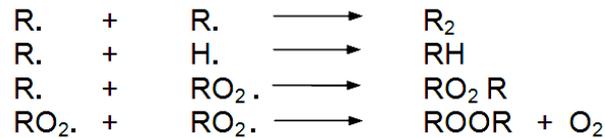


Figura 2 – Etapas do mecanismo de auto-oxidação de lipídios (19, 39, 43, 44)

Os hidroperóxidos são instáveis e se decompõem formando aldeídos, cetonas e álcoois, que são alguns agentes de sabor e odor desagradáveis, principalmente os aldeídos. Estes compostos são chamados de produtos secundários da oxidação. Os aldeídos podem ser oxidados a ácidos, os quais são chamados de produtos terciários da oxidação. O processo é também catalisado por traços de metais, principalmente Cu⁺⁺ e Fe⁺⁺⁺.

2.2.2. Oxidação fotossensibilizada

A fotoxidação – ou oxidação fotossensibilizada - ocorre quando há luz, oxigênio, lipídios e substâncias naturais conhecidas como fotossensibilizadores ou cromóforos. Estas substâncias têm capacidade de capturar e concentrar energia luminosa, passando para o estado excitado. Posteriormente, a energia é transferida para o oxigênio que a absorve passando para o estado singleto (45). Riboflavina, clorofila, mioglobina, hemoglobina são exemplos de compostos com grupos cromóforos. Por esse mecanismo, há mudança da configuração do ácido graxo de *cis* para *trans*, como no caso da auto-oxidação; não há formação de radicais livres e o processo não é inibido por antioxidantes, mas sim por substâncias aniquiladoras de oxigênio singleto, como tocoferóis, β -caroteno, butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT).

Na presença de um sensibilizador adequado, como clorofila ou flavina, a oxidação ocorre via reação ene:

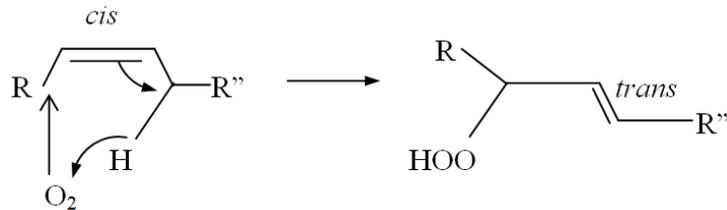


Figura 3 – Mecanismo da oxidação fotossensibilizada (19, 39, 43)

2.2.3. Oxidação enzimática

A oxidação enzimática é causada pelas lipoxidases e desidrogenases e ocorre em plantas, sementes oleaginosas e cereais, onde os ácidos graxos liberados por lipases são degradados. Os produtos finais da oxidação (metil-cetonas) são responsáveis pelo odor de gordura de coco, dentre outras. O processo é também chamado de ranço perfumado.

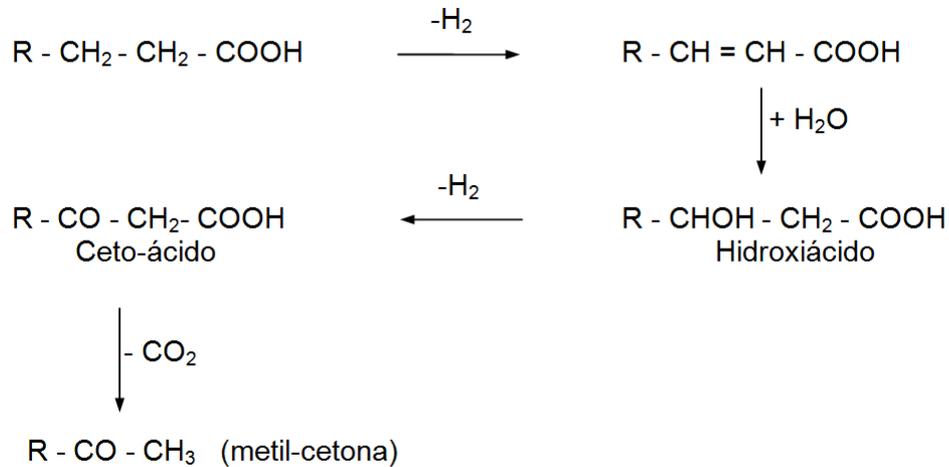


Figura 4 – Mecanismo da oxidação enzimática (19, 39, 43)

2.3 ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS (AGE): CONCEITO, IMPORTÂNCIA, FONTES, LEITE HUMANO

A história cronológica da ciência dos lipídios conta que Tachenius Otto sugeriu, pela primeira vez, em 1693, que compostos ácidos estavam “escondidos” nas gorduras. Em 1813, Michel Engéne Chevreul publicou seu primeiro trabalho sobre a composição da gordura animal e descreveu o conceito de ácidos graxos e, em 1823, publicou *Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale*, onde descreveu, pela primeira vez, vários ácidos graxos (margárico, ou heptadecanoico, oleico, butírico e caproico, ou hexanoico). Em 1827, o médico inglês W. Prout reconheceu as gorduras como importantes nutrientes na dieta, juntamente com proteínas e carboidratos e, em 1913, E. V. McCollum mostrou que certos lipídios devem estar presentes na dieta. Já a essencialidade dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) foi descoberta em 1930 por Go Burr (42).

Os ácidos graxos são constituídos por uma cadeia carbônica alifática de comprimento variável, saturada ou insaturada, com um grupo carboxílico em uma das extremidades e um grupo metila na extremidade oposta.

Geralmente, apenas dois ácidos graxos específicos são considerados como essenciais; isto é, não são sintetizados pelos mamíferos em quantidades

proporcionais às suas necessidades. Ambos são poli-insaturados de cadeia longa (18 átomos de carbono): o ácido α -linolênico (AAL), precursor da família dos AGPI n-3, e o ácido linoleico (AL), precursor dos AGPI n-6.

A essencialidade desses ácidos graxos deve-se ao fato de os mamíferos não terem as enzimas necessárias para inserir a dupla ligação nas posições n-3 e n-6 – respectivamente, Δ -15 e Δ -12 dessaturases, contadas a partir do carbono terminal (metílico), na cadeia de ácidos graxos (46, 47, 48). Por outro lado, a família n-9 pode ser sintetizada a partir de outros AGPI; portanto, o ácido oleico, um n-9, não é essencial.

As três famílias de AGPI citadas são metabolizadas de modo semelhante via uma série de dessaturações e alongações, como mostrado na Figura 2.

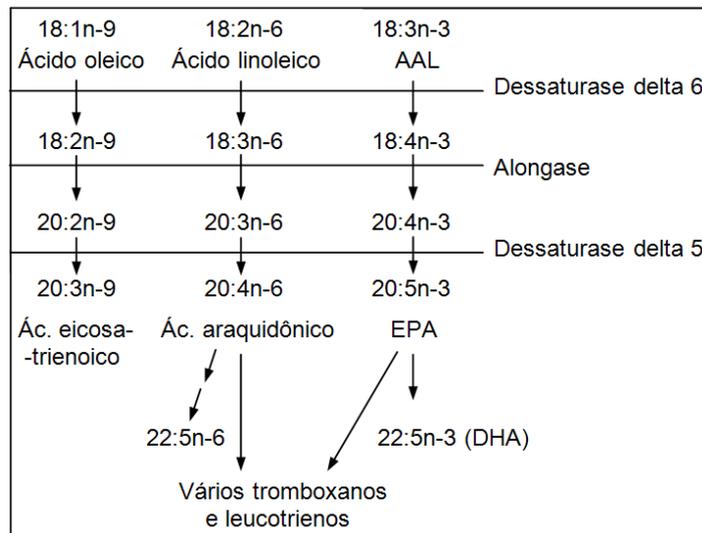


Figura 5 – Vias paralelas do metabolismo de AGPI (48)

Os compostos derivados de n-3 e n-6 são precursores de eicosanoides e, teoricamente, não são essenciais na dieta. Entretanto, trabalhos recentes usando tecnologia de marcadores mostraram que a conversão de AAL a EPA e DPA (docosapentenoico), e a posterior conversão de DPA a DHA, é muito limitada nos humanos. Isso ocorre porque a concentração de AAL nas membranas celulares e nos lipídios sanguíneos é, geralmente, menor que 0,5% do total de ácidos graxos, o que sugere uma limitada influência quantitativa nas funções biológicas (49, 50).

Outro fato é a difícil conversão de EPA a DHA devido à falta da dessaturase Δ -4. Por outro lado, DHA é retroconvertido a EPA via β -oxidação peroxissomal, o que, até agora, não tem demonstrado relevante importância biológica (51). Além disso, DHA reduz a pressão arterial, melhora a função endotelial, aumenta a fração de lipídios de alta densidade (HDL) e reduz a de lipídios de baixa densidade (LDL) (52, 53).

DHA e EPA estão presentes em grandes quantidades nas membranas celulares e no sangue. O DHA, particularmente, é responsável por 20% a 50% dos ácidos graxos do cérebro e da retina (54). Portanto, talvez seja apropriado considerar EPA e DHA como essenciais (27, 55).

Entre os AGPI, os n-3 são os que possuem capacidade imunomoduladora mais potente e, entre os n-3, os EPA e DHA encontrados em óleos de peixes são biologicamente mais potentes que seu precursor – o AAL. Também foi demonstrado que alguns AG n-3 possuem potente atividade anti-inflamatória e podem ser úteis no controle de doenças inflamatórias e auto-imunes.

Minda et al.,(56) demonstraram que a composição do leite humano sofre alteração durante a lactação, especialmente a de alguns ácidos graxos, como o AG essencial AAL, cuja concentração aumentou significativamente durante as duas primeiras semanas de lactação, enquanto a concentração do AG essencial n-6 (AL) não variou durante o primeiro mês de lactação. No caso dos metabólitos do n-6 (ácidos eicosadienoico, dihomo- γ -linolênico e araquidônico) e do n-3 (ácidos eicosatrienoico e eicosapentenoico), os autores observaram aumento significativo durante todo o período investigado (até 28 dias de lactação). O principal metabólito do AGPI n-3, o DHA, teve significativo aumento entre o 3º e o 14º dia, mas também significativo decréscimo entre o 14º e o 28º dia. Estatisticamente, houve correlação significativamente positiva entre os ácidos araquidônico e docosahexenoico nos 1º, 5º e 6º dias de lactação; no entanto, tal correlação não existiu entre ácidos graxos essenciais e seus metabólitos de cadeia longa, sugerindo que a disponibilidade de ácidos graxos essenciais não é o único fator que influencia a composição do colostro humano.

Essa variação na composição do leite humano foi também estudada por Hall (57). A autora, no trabalho *Uniformity of Human Milk*, concluiu que durante a

amamentação o teor de lipídios totais triplicou (na média, de 2,4g/100mL a 7,5g/100mL), o de proteína aumentou 1,3 vezes e o extrato seco 1,5 vezes. Não houve aumento no teor de lactose e, embora o teor de lipídios tenha variado, não houve diferença na composição de ácidos graxos constituintes, que não é aleatória (é uniforme) e pode ser prevista pela dieta da mãe.

Do mesmo modo, com o avanço da lactação o teor de lipídios aumentou 2% três dias após o parto, na seguinte ordem: colostro, leite de transição, leite maduro. Após 3 meses, o aumento foi maior que 4% (58).

Segundo Read, Lutz e Tashjian (59), o padrão de ácidos graxos do leite humano só teria grandes variações no caso de subnutrição da lactante ou grande alteração na dieta, como no caso de alta ingestão de carboidratos (amido) ou de lipídios (azeite de oliva). No primeiro caso, o leite é rico em ácidos graxos de cadeia curta e pobre em ácido linoleico (1%); no segundo, o leite é rico em ácidos palmítico, esteárico e oleico e diminuem com a lipemia.

No leite humano, a origem dos AGPI de cadeia longa pode ser proveniente da dieta materna, dos estoques maternos e da síntese endógena a partir dos precursores com 18 átomos de carbono, o que ocorre no fígado, glândula mamária e outros tecidos (23). Portanto, a dieta materna influencia o conteúdo de EPA, DHA e AAR no leite, sendo peixe, leite, carne e ovos boas fontes desses compostos (23, 60). Embora haja tal influência, Koletzko et al. (23), Demmelmair et al. (61) e Sauerwald et al. (47), em estudos com isótopos estáveis, demonstraram que a dieta materna não é a principal origem da proporção de AGPI no leite.

2.4 ASPECTOS QUÍMICOS E NUTRICINAIS DA FRAÇÃO LIPÍDICO EM LEITE HUMANO

O leite humano apresenta a mesma composição de macronutrientes do leite de outros mamíferos, variando, porém, sua concentração e constituição (Tabela 2). Essa variação, acredita-se, é apropriada para cada mamífero e o seu leite, com alguma exceção, contém os nutrientes necessários para o desenvolvimento da cria. Se esse desenvolvimento é rápido, então o leite será denso em nutrientes (18). Para

isto, o perfil proteico, a digestibilidade da fração lipídica, a presença de lactose, de minerais, de vitaminas e de outros componentes têm papel importante.

Tabela 2 – Composição aproximada (% peso) dos leites bovino, humano, de cabra e de ovelha (18)

Componentes	Bovino	Humano	Cabra	Ovelha
Proteína	3,4	1,0	2,9	5,5
Caseína	2,8	0,4	2,5	4,6
Gordura	3,7	3,8	4,5	7,4
Lactose	4,6	7,0	4,1	4,8
Cinzas	0,6	0,2	0,8	1,0

Esses nutrientes estão assim organizados: os lipídios estão emulsificados em glóbulos de 2µm a 4µm de diâmetro, revestidos por uma membrana derivada de células secretoras; as proteínas estão dispersas em micelas coloidais e a maioria dos minerais e a fração de lactose estão em solução verdadeira (21, 62, 63).

Os lipídios do leite humano contêm mais de 200 ácidos graxos e os do leite bovino apresentam mais de 400 tipos de tais substâncias. No entanto, enquanto o leite bovino contém uma quantidade substancial de ácidos graxos de cadeia curta (C4:0 a C10:0) provenientes da atividade ruminal, o leite humano contém menor concentração de ácidos graxos saturados, maior teor dos ácidos oleico e linoleico, pequena quantidade de outros poli-insaturados e menor atividade hipercolesterolêmica, como mostra a Tabela 3 (21, 62, 64).

Um dado a ser considerado no metabolismo dos triglicerídios (TG) é o fato de os ácidos graxos no leite humano estarem (98% deles) ligados ao glicerol. Isto porque a estrutura posicional dos ácidos graxos controla a liquidez dos glóbulos de gordura e a identidade dos produtos formados pela lipólise sequencial dos TG no estômago e intestino delgado; assim, os AGL e os monoglicerídeos são absorvidos. A estrutura pode ser definida como uma identidade do AG em cada uma das posições *sn-1*, *sn-2*, *sn-3* e seu arranjo no TG em questão (21).

Tabela 3 – Composição em ácidos graxos dos leites bovino e humano em g/100g de gordura (62)

Ácido Graxo	Bovino	Humano
Butírico (C4:0)	3,3	–
Caproico (C6:0)	1,6	Traços
Caprílico (C8:0)	1,3	Traços
Cáprico (C10:0)	3,0	1,3
Láurico (C12:0)	3,1	3,1
Mirístico (C14:0)	14,2	5,1
Pentadecanoico (C15:0)	1,3	Traços até 0,4
Palmítico (C16:0)	42,7	20,2
Palmitoleico (C16:1; 9c)	3,7	5,7
Estearico (C18:0)	5,7	6,0
Oleico (C18:1; 9c)	16,7	46,4
Linoleico (C18:2; 9,12cc)	1,6	13,0
Linolênico (C18:3; 9,12,15ccc)	1,8	1,4
Total de saturados	76,2	36,1
Hipercolesterolêmicos ¹	61,3	28,8

¹Total de ácidos graxos hipercolesterolêmicos (12:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0)

No leite humano (LH), o ácido palmítico (AP) (C16:0) está predominantemente esterificado na posição *sn-2* (ou β) do TG, enquanto nos óleos vegetais está nas posições *sn-1* (ou α) e *sn-3* (ou α'). Esse tipo de disposição é fundamental, haja vista que as lipases pancreáticas hidrolisam seletivamente os ácidos graxos nas posições *sn-1* e *sn-3* produzindo *sn-2* monoacilgliceróis e ácidos graxos livres (AGL) que são absorvidos, reesterificados e secretados no plasma. O ácido palmítico livre liga-se ao cálcio e torna-se insolúvel no intestino e, portanto, não é bem absorvido, sendo eliminado nas fezes. Assim, o posicionamento dos ácidos graxos saturados, particularmente do AP na posição *sn-2*, torna tanto os ácidos graxos na forma de *sn-2* monoacilgliceróis e o cálcio do leite completamente absorvidos. Por outro lado, se um triglicerídeo não fosse hidrolisado, não apenas sua absorção seria prejudicada, mas também a de nutrientes lipossolúveis como o tocoferol e a vitamina A (9, 65, 66).

Nesse aspecto, Carnielli et al. (67) estudaram, em fórmulas infantis, o efeito posicional do AP sobre a gordura, AG e o balanço mineral. Segundo os pesquisadores, a maior concentração de AP na posição *sn-2* aumentou a absorção intestinal de gordura e de cálcio, quando comparado com fórmulas infantis com AP em concentrações menores na mesma posição.

No entanto, segundo Pafumi et al. (68), a lipase gástrica humana só hidrolisa 10% a 30% dos triacilgliceróis ingeridos em função de um processo de inibição induzido pelos ácidos graxos de cadeia longa gerados, que estão protonados pelo pH ácido. Para Carrière et al. (69), a lipase gástrica humana e a lipase pancreática apresentam baixa atividade específica, mas suficiente para hidrolisar completamente os triacilglicerídeos em função das quantidades dessas enzimas secretadas durante a refeição.

O estado de liquidez é importante para a formação de microgotículas nas células secretoras e sua posterior fusão em gotas maiores que são então secretadas como glóbulos. Estes permanecem líquidos até ser hidrolisados pelas lipases no estômago e intestino delgado dos lactentes, o que é facilitado por sua grande área superficial exposta à ação enzimática (21).

Alguns ácidos graxos podem ser sintetizados pelo organismo, outros não. No primeiro grupo incluem-se os ácidos graxos de cadeias curta, média e longa, saturados e monoinsaturados. No segundo estão os chamados ácidos graxos essenciais, que devem ser obtidos via dieta. Alimentos como peixe, leite, carne e ovos aumentam a concentração de AGPI de cadeia longa no leite humano, como também dos ácidos eicosapentenoico (EPA, 20:5n-3), dosocahexenoico (DHA, 22:6n-3) e araquidônico (AAR, 20:4n-6). DHA e AAR são importantes componentes estruturais do sistema nervoso central, transferidos através da placenta e acumulados no cérebro e outros órgãos durante o desenvolvimento fetal. Após o nascimento, a transferência é via leite materno, se a amamentação for exclusiva. A redução de DHA pode causar diminuição da acuidade visual – o que indica um papel crítico do DHA no metabolismo neurotransmissor – e dificuldade de aprendizagem. O desenvolvimento cognitivo é dependente de dopamina que, por sua vez, tem seu metabolismo afetado pela deficiência de ácidos graxos n-3, o que explica, em parte,

a deficiência de aprendizagem pela falta do dopaminérgico modulador de atenção e motivação (47, 70, 71, 72, 73).

O DHA pode ser formado no fígado a partir do AAL, mas não está claro se essa síntese, em humanos, é suficiente para permitir um ótimo desenvolvimento cerebral e da retina (60, 74). No entanto, segundo Tinoco et al. (11), os lactentes recebem, via aleitamento materno, 200mg de AAR e concentrações menores que 100mg de DHA/dia, suficientes para as necessidades do crescimento e do desenvolvimento e que varia conforme a dieta materna e o estágio de lactação.

Outros autores sugerem que a ingestão de ácidos graxos essenciais não é tão importante quanto os estoques corporais maternos para a síntese de AGPICL (61); ou seja, esses são mais utilizados na síntese de AGPICL que aqueles.

A variação do volume e da composição do leite humano pode ser minimizada pela mistura dos leites de várias doadoras. No caso do leite bovino, a composição em ácidos graxos e, portanto, a estrutura do triacilglicerol, não é afetada por mudanças na dieta em função da biohidrogenação e da produção de ácidos graxos de cadeia curta no rúmen. Como a composição em ácidos graxos do leite humano sofre o efeito da dieta, espera-se que a estrutura do triacilglicerol também mude (75). Estudos de Jensen et al. (62) demonstraram que, quando a dieta era rica em poli-insaturados, o 18:2 deslocava o 16:0 da posição *sn*-2.

Outra característica importante do leite humano é a presença da lipase estimulada por sais biliares, que é muito ativa no intestino de lactentes amamentados. Por lipólise, essa enzima produz ácidos graxos livres e monoacilgliceróis que apresentam atividade contra alguns parasitas intestinais, como a giárdia, e vírus encapsulados. Esse efeito microbicida é um potente mecanismo de defesa dos recém-nascidos, principalmente nos países do terceiro mundo; no entanto, o leite deve ser cru, o que não acontece com os leites bovino, nos laticínios, e o humano, nos bancos de leite, uma vez que são pasteurizados (62, 63).

Sabe-se, também, que lactentes amamentados ganham peso mais facilmente. Isto é atribuído à melhor digestibilidade da proteína do leite humano e melhor absorção dos lipídios. A ausência da fração α S-1 da caseína e a presença de altas concentrações de ácidos graxos insaturados no leite humano o tornam mais

digerível que o leite bovino, que forma um coágulo denso no estômago do recém-nascido. Desta forma, a atuação da pepsina e da tripsina é retardada pela neutralização do ácido clorídrico do suco gástrico pelos sais do leite - efeito salino tampão (76).

Há muito tempo estuda-se a importância entre a relação do aleitamento materno e o desenvolvimento do recém-nascido, como também entre o aleitamento e o estímulo à habilidade cognitiva. Horwood e Ferguson (77), em seus estudos, observaram que a maior duração do aleitamento materno está associada ao aumento do coeficiente de inteligência (QI) e do rendimento escolar nas idades avaliadas (de 8 a 18 anos).

Em um trabalho anterior, Tembours et al. (78) observaram que lactentes alimentados com mamadeira apresentavam desenvolvimentos mental e motor inferiores àqueles amamentados ao seio. Semelhantemente, Lanting et al. (79) realizaram avaliação neurológica em crianças aos 9 anos de idade, dentre as quais 135 foram amamentadas e 391 foram alimentadas exclusivamente com fórmulas, ou receberam suplementação com leite artificial nas primeiras três semanas de vida, e notaram que as últimas apresentaram o dobro do risco de disfunção neurológica em relação às que haviam sido exclusivamente amamentadas por, pelo menos, 21 dias.

Por sua vez, Lucas et al. (80) avaliaram o quociente de inteligência (QI) de crianças, aos 8 anos de idade, que foram lactentes prematuros alimentados com fórmulas e compararam os resultados com crianças da mesma idade que receberam leite materno após o nascimento, todas por sonda nasogástrica, para eliminar a interação entre mãe e lactente. Os pesquisadores notaram que as crianças que foram amamentadas tinham QI significativamente maior aos 7,5-8,0 anos de idade do que as outras, com até 8,3 pontos de diferença. Concluíram que o leite materno possui vários fatores que conferem vantagens para o desenvolvimento cognitivo, entre os quais os ácidos graxos de cadeia longa, especialmente o DHA, presente em alta concentração no leite de mães de prematuros, e que estão ausentes nas fórmulas infantis.

Innis; Gilley; Werker, (81) estudaram a relação entre os ácidos graxos de cadeia longa do leite humano e o desenvolvimento visual e neural de crianças

nascidas a termo e alimentadas ao seio; concluíram que há relação significativa entre o DHA e a acuidade visual, o DHA e a percepção da fala – inclusive habilidade para reconhecer termos em língua não-nativa. Com relação ao desenvolvimento neural, os autores concluíram que, se houver falta de DHA pré-formado, o conteúdo de ácido linolênico no leite de muitas mães pode não ser suficiente para fornecer o DHA necessário para tal. Por outro lado, encontraram uma associação contrária a de outros autores entre DHA e peso aos 6 meses de idade: a possibilidade de os ácidos graxos n-3 influenciarem a adipogenia, uma vez que eles são importantes reguladores dos genes envolvidos no metabolismo dos ácidos graxos, questão que ainda deve ser mais estudada.

Jorgensen et al. (82), em trabalho semelhante, também concluíram que há associação significativa entre a acuidade visual em recém-nascidos a termo e o DHA do leite materno, assim como a frequência da ingestão de peixes (magros ou gordos) estava fortemente associada com os níveis de DHA no leite. No entanto, os ácidos araquidônicos, EPA, linoleico e α -linolênico não estão correlacionados com a acuidade visual.

Em um trabalho mais recente, Singhal et al. (83) sugerem que a nutrição infantil afeta permanentemente o perfil lipoproteico durante a vida e que a amamentação tem efeito benéfico sobre a saúde cardiovascular. Neste aspecto, os autores concluem que adolescentes nascidos pré-termo amamentados ao seio, assim como os que receberam leite de outras mães, têm perfil lipoproteico aterogênico menor do que os alimentados com fórmulas infantis, apresentando concentrações mais baixas de colesterol e menor relação LDL/HDL.

2.5. ÁCIDOS GRAXOS *TRANS* (AGT)

Gorduras *trans* (ou ácidos graxos *trans*) são ácidos graxos insaturados com, no mínimo, uma ligação dupla na configuração *trans*, ou seja, os átomos de hidrogênio estão em lados opostos na ligação dupla permitindo que a molécula tenha uma orientação semelhante ao que ocorre com os ácidos graxos saturados. Ao contrário, na configuração *cis* a molécula é curvada; isso explica o aumento do

ponto de fusão nas gorduras *trans* quando comparado com o seu isômero *cis* (Figura 6).

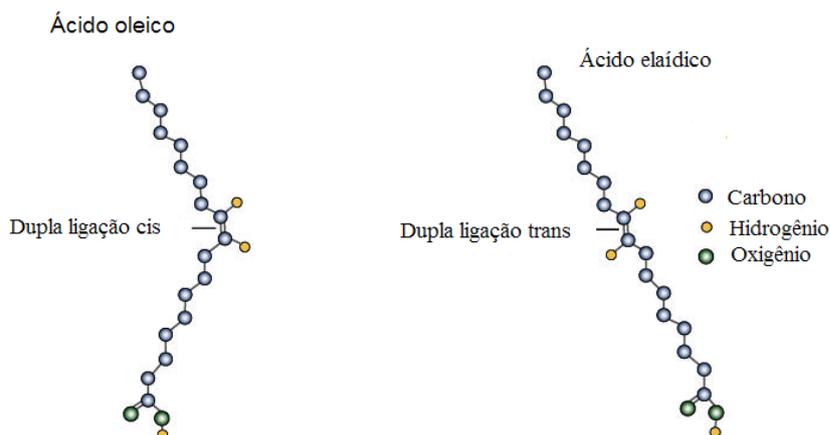


Figura 6 – Estruturas dos ácidos graxos oleico (C18:1, 9c; PF 13°C-14°C) e elaídico (C18:1, 9t; PF 44°C) (84)

A configuração *cis* também é chamada de forma **Z** (do alemão, *zusammen* – juntos); a *trans*, de forma **E** (do alemão, *entgegen* – opostos) (85).

De modo geral, gorduras *trans* são metabolizadas de modo semelhante aos isômeros *cis* (86, 87, 88); no entanto, há alteração das propriedades fisiológicas e dos efeitos do ácido graxo que sofreu a mudança de configuração (84). Seu acúmulo nos tecidos reflete o consumo por longo tempo (89) e são oxidadas para fornecer energia. Também não são sintetizadas no organismo humano, mas ocorrem, naturalmente, em pequena quantidade nos alimentos produzidos a partir de ruminantes (leite, carne bovina) (90). Entretanto, Adlof; Duval; Emken (91) e Turpeinem et al. (92) consideram que há indicações de que a bioconversão de ácido vacênico (C18:1,11t) – obtido da dieta – a ácido rumênico (C18:2, 9c,11t) também ocorre em humanos via dessaturase $\Delta 9$. Contudo, a maioria dos ácidos graxos *trans* da dieta são provenientes da hidrogenação catalítica de óleos vegetais usados na produção de margarinas, cremes vegetais, óleos refinados, pães, biscoitos, alimentos fritos, sorvetes, bolos, pastéis.

O consumo de grandes quantidades de AGT teve início por volta de 1912, quando as indústrias desenvolveram métodos para a hidrogenação catalítica de lipídios insaturados (93). No Brasil, esse processo teve início por volta de 1960 com

a hidrogenação catalítica de óleos vegetais para as indústrias de alimento (94). Nesse caso, o principal AGT é o elaídico (18:1, 9t); em ruminantes é o vacênico (18:1, 11t) (85, 95).

O processo de hidrogenação é controlado selecionando-se a temperatura, a pressão, a duração, o catalisador, assim como a(s) gordura(s), para se obter um produto com composição e propriedade funcional apropriadas. A hidrogenação parcial de óleos e gorduras resulta em uma mistura de ácidos graxos: poli-insaturados (incluindo isômeros *trans*), monoinsaturados (também incluindo isômeros *trans*) e saturados. Prosseguindo a hidrogenação, a proporção de poli-insaturados diminui, a de monoinsaturados e ácidos graxos *trans* aumenta e a de saturados diminui, levemente. As gorduras vegetais hidrogenadas são os maiores contribuintes, atingindo 80% a 90% da ingestão diária de AGT (84, 94, 96, 97, 98, 99).

A hidrogenação parcial de óleos vegetais leva à formação de vários isômeros, onde a dupla ligação *trans* pode ocorrer em qualquer local entre o quarto e o décimo carbonos; podem também ser formados isômeros com duas duplas ligações (*trans-cis*; *cis-trans*) (84).

A hidrogenação com formação de ligações *cis-trans* está exemplificada na figura 4, onde (a) representa a formação do complexo organometálico intermediário (carbono-metal) em qualquer extremidade da ligação olefínica; (b) ou (c) representa a adsorção de hidrogênio no catalisador, que pode ser Ni, Pd ou Pt, formando compostos instáveis; (d) indica que o composto instável pode reagir com outro átomo de hidrogênio e sofrer dessorção do catalisador formando um composto saturado, ou ceder um átomo de hidrogênio ao catalisador formando uma dupla ligações que pode estar na mesma configuração original ou ser um isômero posicional ou geométrico da dupla ligação original (e, f).

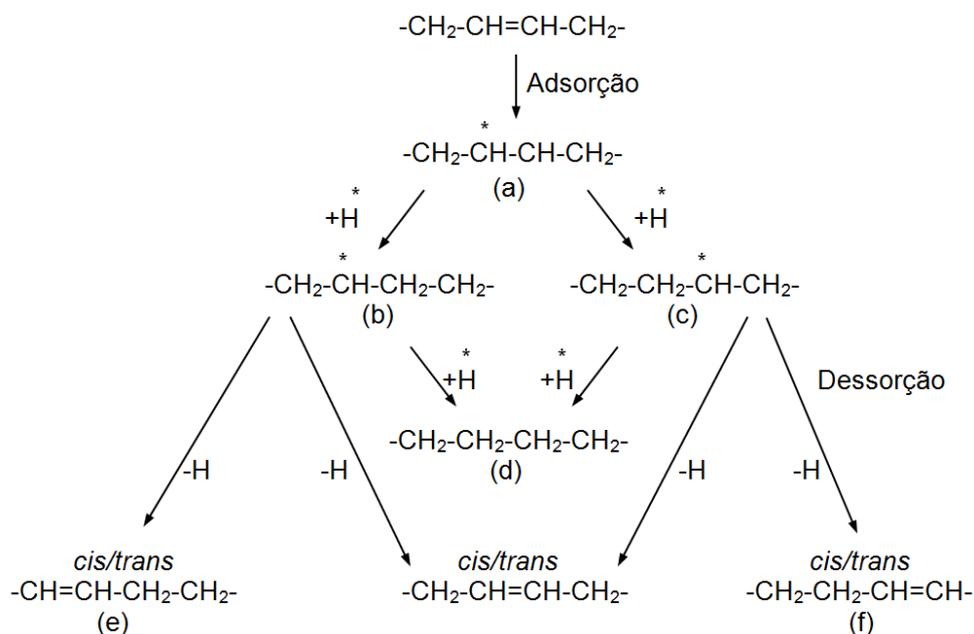


Figura 7 – Hidrogenação catalítica com formação de duplas ligações *cis/trans*. O asterisco representa a ligação com o catalisador (19)

Atualmente, para evitar a formação de AGT via hidrogenação catalítica, as indústrias fazem a interesterificação de óleos vegetais. Esse processo consiste no intercâmbio de radicais acila entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise), ou entre ésteres (transesterificação). Este último, o mais importante na indústria de alimentos, implica no intercâmbio dentro de uma mesma molécula de triacilglicerol (intraesterificação) e entre moléculas diferentes (FENNEMA, 1993).

Esse tipo de rearranjo na molécula de glicerol permite a redução do conteúdo de AGT no produto final, mas aumenta o de ácidos graxos saturados com as consequências já conhecidas, como o aumento do colesterol sanguíneo e o aumento do risco de doenças cardiovasculares (99, 100). A gordura *trans* tem grande interesse aplicativo na indústria de alimentos, pois apresenta maior vida de prateleira, é mais estável durante os processos de fritura, além de melhorar a palatabilidade dos alimentos que as contêm (84, 101).

Em hortaliças, embora seja rara a presença de AGT, 70% dos ácidos graxos da semente de romã são constituídos por ácidos graxos insaturados, sendo o

punícico [18:3 (9c,11t,13c)], um ômega-5 isômero do ácido linolênico conjugado, presente em maior quantidade (58,14%) (102).

As implicações nutricionais dos ácidos graxos *trans* sobre a saúde humana são estudadas há várias décadas. No início dos anos 60 já se estudavam os efeitos da ingestão de gorduras hidrogenadas nos níveis de colesterol (103). Em 1990 foi demonstrado que os ácidos graxos *trans* aumentam os níveis de LDL e diminuem os de HDL de modo similar aos ácidos graxos saturados (84, 94, 100, 104, 105), além de aumentar a relação colesterol total/colesterol LDL – um forte indicador de risco cardiovascular – aumentar os níveis de triglicerídios no sangue, os níveis de lipoproteína A (outro possível fator de risco coronário) e reduzir o tamanho das partículas de LDL-colesterol (84, 106 107; 108).

Há evidências de que os ácidos graxos *trans* promovem processos inflamatórios que podem levar à aterosclerose, morte súbita por causas cardíacas (21, 109, 110, 111). Jensen (21), em revisão sobre lipídios em leite humano, relatou que o ácido linoleico conjugado (CLA) [C18:2 (9c, 11t)], ou ácido rumênico, proveniente de derivados lácteos, pode exercer atividade anticarcinogênica, antiaterosclerótica e outras. Nessa mesma linha, foram identificadas atividades biológicas antimutagênicas e anticâncer do *cis/trans* CLA (112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121), antiaterogênica (122), regulador de gordura (123) e imune modulador (124, 125).

Em função dessas implicações nutricionais, a *Food and Drug Administration* (FDA) sugeriu, em 1999, a inclusão do teor de AGT nos rótulos dos produtos (FDA, *in* 11). No Brasil, em 2006, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou que a rotulagem informe, obrigatoriamente, a quantidade desses ácidos graxos (126).

Considerando os possíveis problemas que podem advir da ingestão de AGT, o uso de biomarcadores torna-se uma medida eficaz para sua mensuração. Aceita-se, geralmente, que os padrões de ácidos graxos no plasma refletem sua ingestão recente (dias) e, nos tecidos adiposos, de meses ou anos. Vários estudos realizados e comparados indicam que o conteúdo de AGT no tecido adiposo humano correlaciona-se com sua ingestão de fontes vegetais, mas não animal (89), e a

distribuição da dupla ligação dos isômeros *trans* do C18:1 no tecido adiposo assemelha-se ao de óleo de soja parcialmente hidrogenado (127). Assim, Baylin et al. (128) concluíram que o ácido oleico do tecido adiposo é o melhor indicador da ingestão de gordura saturada e, no tecido adiposo, o C18:2 (9c, 11t) e o C18:2 (9t, 12c); em segundo lugar, o C18:1(t) e o C16:1(t). Segundo os autores, quase todos os ácidos graxos C18:2(t) do tecido adiposo eram derivados de óleos vegetais hidrogenados, enquanto o C18:1(t) refletia uma mistura de óleos vegetais e gorduras animais.

A transferência de ácidos graxos *trans* (AGT) para os fetos tem sido objeto de estudos. Em uma revisão sobre o assunto, Larqué; Zamora e Gil (129) consideram que a transferência através da placenta é controversa, requer mais estudos, e que o leite materno reflete a ingestão diária de ácidos graxos *trans*, de 2% a 5% dos ácidos graxos totais do leite humano. Tal controvérsia origina-se do fato de os níveis de AGT fetais serem menores que os encontrados no sangue materno, o que pode, também, refletir certo grau de discriminação contra esses isômeros na placenta. Interessante também notar que o cérebro incorpora pouco AGT, o que corrobora com a discriminação placentária (120).

Alimentos como margarinas, gordura vegetal hidrogenada, biscoitos e vários outros produtos industrializados são alguns dos responsáveis pelo aumento da concentração de AGTs no leite humano, uma vez que humanos não os sintetizam (131). O conteúdo de AGTs no leite materno também varia de acordo com o período de lactação – exceto após o estabelecimento da produção de leite maduro (132); o principal AGTs é o ácido vacênico (*trans* Δ -11), isômero posicional do *trans* 18:1 encontrado no leite de vaca e oriundo da biohidrogenação bacteriana que ocorre no rúmen (133).

A influência da dieta na composição de ácidos graxos do leite humano foi investigada por Insull et al.(134). Esses autores relatam que mulheres submetidas à dieta deficiente em calorias produziram leite com perfil de ácidos graxos semelhantes ao do tecido adiposo, o que sugere um processo de transferência. Por outro lado, quando a dieta foi excessivamente calórica, mas sem gordura, os autores esperavam que os carboidratos fossem convertidos em ácidos oleico, palmítico e

esteárico nos vários sítios de síntese, incluindo os seios, uma vez que animais alimentados com esse tipo de dieta apresentam gordura com 75%, aproximadamente, desses três ácidos graxos. Entretanto, nessa condição dietética, 60% dos ácidos graxos do leite humano foram constituídos pelo láurico, mirístico e palmítico, com decréscimo de esteárico, oleico e linoleico. Uma vez que nenhum grupamento éster do soro mostrou altas concentrações dos ácidos láurico e mirístico, não houve qualquer evidência de que esses ácidos, se sintetizados em sítio extramamário, foram transportados para o leite via sangue. Portanto, segundo os autores, a síntese de ácidos graxos pela glândula mamária parece ser promovida quando a dieta é rica em calorias e o acúmulo dos ácidos láurico (C12:0) e mirístico (C14:0) no leite sugere que a síntese difere em aspectos importantes com relação àquela que ocorre extramamária.

Tinoco et al. (11), em artigo sobre a presença de AGT no leite de mães de recém-nascidos prematuros, afirmam que a dieta da lactante pode ter impacto na qualidade e na disponibilidade de ácidos graxos importantes no leite produzido durante o período de amamentação. É o caso da ingestão materna de AGTs durante a amamentação exclusiva, que resulta na incorporação desses ácidos pela glândula mamária e, por consequência, no leite, em parte mediado pela alta atividade da enzima LPL (lipase lipoproteica) nos tecidos mamários. Além de decréscimo da síntese *de novo* de ácidos graxos na glândula mamária, podem ocorrer efeitos nutricionais no desenvolvimento infantil por afetar o metabolismo de ácidos graxos essenciais e a biossíntese de AGPI de cadeia longa, tais como o AA e DHA.

A incorporação de AGT nos tecidos aumenta os níveis de ácido linoleico e diminui os de AA e DHA, sugerindo um efeito inibitório dos *trans* sobre a atividade da enzima Δ -6 dessaturase e, portanto, no sistema de dessaturação dos ácidos graxos essenciais (135).

De fato, Aitchison et al. (132) sugerem que outros fatores, além da dieta, influenciam a concentração de AGT no leite humano; é o caso, por exemplo, do armazenamento de AGT no tecido adiposo que pode contribuir significativamente para a presença de C18:1t observada no leite. Tal influência foi notada por Field; Angel; Clandinin (136), ao verificarem que a relação entre a composição de ácidos

graxos da dieta e do tecido adiposo sugere que qualquer efeito desse tecido no perfil de AG pode ser obscurecido pela influência da dieta materna.

2.6 BANCOS DE LEITE HUMANO (BLH's)

A história do aleitamento materno no Brasil remonta à época do descobrimento, quando a prática adotada era a amamentação por amas de leite, às vezes alugadas ou compradas como escravas para amamentar os filhos de seus “donos”. Mesmo após a abolição da escravidão ainda era comum tal prática (137).

No século XVIII foram iniciadas as campanhas para esclarecer a população sobre a necessidade da amamentação em um contexto diferente daquele adotado ao final do século XIX, que propunha a modificação de comportamentos culturais, e início do século XX, em que a tecnologia do beneficiamento tornava o leite de vaca pasteurizado ou desidratado disponível como substituto do leite humano. Esse último fato foi o responsável pelo aumento nas taxas de mortalidade infantil em decorrência de diarreias e desnutrição (138) porque, naquela época, pouco se conhecia sobre o papel protetor do leite humano e de seus constituintes imunológicos (137).

Sabe-se que o leite apresenta atividade antimicrobiana devido à presença de xantina-oxidase, que gera, na presença de nitrito, compostos como óxido nítrico (em condição anaeróbia) e peroxinitrito (em condição aeróbia), responsáveis por tal atividade (35, 76, 139, 140). Isto explicaria, segundo Stevens et al. (139), o aumento da incidência de gastroenterite infecciosa em lactentes alimentados com fórmulas infantis, uma vez que estas não são adicionadas de xantina-oxidase.

Em 1943 foi implantado o primeiro Banco de Leite Humano (BLH) no Brasil, no então Instituto Nacional de Puericultura, atual Instituto Fernandes Figueira (IFF), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), com os objetivos de coletar e distribuir leite humano para atender os casos especiais como prematuridade, distúrbios nutricionais e casos de alergias a proteínas heterólogas. Posteriormente, novas unidades foram implantadas e, hoje, o Brasil conta com a maior rede de BLH do mundo, que totaliza 193 unidades (141), não permitindo que milhões de litros de leite

humano sejam perdidos e reduzindo a mortalidade infantil pelo incentivo ao aleitamento materno (142). Segundo Salviano (143), até o final deste ano, mais 15 unidades de BLH serão inauguradas no país. No ano de 2003 foram coletados 70,5 mil litros de leite humano beneficiando, aproximadamente, 101 mil receptores (144).

Na década de 70 começaram a surgir recomendações mundiais enfatizando a importância da retomada da amamentação exclusiva até os seis meses de idade (145). No Brasil, esse movimento foi consolidado em 1974 com o Programa Materno Infantil e, em 1981, com o Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (138). Não obstante os esforços dos programas nacionais e internacionais, sabe-se que, ainda hoje, o desmame precoce é bastante acentuado, constituindo-se em grave problema de saúde pública (146, 147).

Há várias justificativas para a interrupção da prática do aleitamento materno: os altos índices de desemprego, que obrigam as mulheres de baixa renda a participarem do orçamento familiar; o retorno da mulher ao trabalho fora do lar; a falta de informações sobre a importância do aleitamento materno, que conduz a questões como 'o leite é fraco e não sustenta', a 'criança chora muito'; a introdução precoce de água e chás; a falta de preparação das mães durante o pré-natal; a falta de informação e de apoio dos profissionais da área de saúde após o parto (138, 148, 149, 150, 151, 152).

De todas essas justificativas, as mais comuns são "o bebê chora muito" e "o leite é fraco", levando as mães a associarem um fator ao outro: "o bebê chora muito porque o leite é fraco" (153). Em trabalho mais recente, Moura (154) demonstrou que o período de aleitamento exclusivo tem aumentado e que o desmame total no primeiro semestre de vida de seus filhos tem como justificativas "a criança não quis mais" e "o seio secou".

Evidentemente, a amamentação deve ser seguida de práticas que mantenham a inocuidade e as qualidades nutricional e imunológica do leite, o que pode ser feito com procedimentos técnicos e higiênico-sanitários adequados desde a coleta até a distribuição. Um alto grau de contaminação no leite cru pode levar à redução do seu valor imunológico e à conseqüente redução na proteção do lactente (155), haja vista que o leite ordenhado de doadoras saudáveis é

microbiologicamente inócuo. Portanto, a detecção de micro-organismos patogênicos indica contaminação externa e condições higiênico-sanitárias inadequadas (156).

2.6.1 Beneficiamento e controle de qualidade em bancos de leite humano

Para garantir a inocuidade, são práticas obrigatórias nos BLHs brasileiros a pasteurização lenta do leite humano ordenhado e as análises microbiológicas indicativas da presença de coliformes totais. Com o processo térmico, há eliminação de possíveis patogênicos e de 100% do vírus HIV (157). Por outro lado, fatores de proteção – como as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, lisozimas e lactoferrina (importantes protetores antivirais e antibacterianos), fator bífido, macrófagos, linfócitos, granulócitos, neutrófilos, partes da flora microbiana normal e dos ácidos linoleico e linolênico também são destruídos em maior ou menor grau, dependendo da suas termorresistências (155, 158).

No caso de fatores proteicos, embora o valor nutricional não seja muito afetado, suas funções bioativas específicas o são; esse não é o caso da proteína total e da IgA do leite de mães pré-termo, que têm boa retenção após o processo térmico em função da sua maior concentração no colostro e reduzido decréscimo durante a lactação (159). No entanto, lisozima e lactoferrina sofrem perda de 75% e 60%, respectivamente (6).

Por outro lado, lipídios bioativos (triacilgliceróis, diacilgliceróis, AG, AGPI e fosfolipídios) com atividades anticâncer, antimicrobiana, anti-inflamatória e imunossupressora (9, 159), incluindo lipases endógenas, são inativadas pela pasteurização. Isso significa que os lipídios não podem ser vistos apenas como fornecedores de energia na dieta; devem também ser consideradas suas estruturas e composição, porque podem influenciar não apenas na absorção dos próprios lipídios e das vitaminas lipossolúveis, mas também na absorção, metabolismo e ação de componentes não essenciais bioativos (9). De qualquer modo, o processo térmico assegura a inocuidade do leite, cuja contaminação ocorre, geralmente, durante a coleta e a ordenha (6).

Convém ressaltar que 65% das proteínas do colostro são representadas pela IgA e pela lactoferrina, enquanto o leite maduro contém menos de 20% da proteína, como fator antimicrobiano, sete semanas após o parto (76). Juntas, IgA, IgM e IgG representam cerca de 88% a 94% das imunoglobulinas presentes no leite, sendo a concentração de IgA muito maior no colostro (12mg/mL) do que no leite maduro (1mg/mL), segundo Van de Perre (160). Interessante acrescentar que, segundo Sarkar (76), o efeito protetor do leite é perdido durante sua armazenagem refrigerada e a fervura reduz o efeito da IgA e, portanto, o leite deve ser fornecido à criança logo após a ordenha.

Ainda assim, deve-se considerar que a pasteurização não elimina todos os micro-organismos, mas permite, parcialmente, a manutenção das propriedades bacteriostáticas do leite. Por isso, as operações de aquecimento e posterior resfriamento e/ou congelamento devem ser rigorosamente sequenciadas para evitar que os micro-organismos sobreviventes desenvolvam-se no leite à custa de seus nutrientes (156, 161, 162).

Além do aspecto microbiológico, há que se cuidar da saúde da lactante, da assepsia durante todo o período de lactação, do atendimento às Normas Técnicas estabelecidas pela Rede Nacional de Bancos de Leite Humano/FIOCRUZ para que o produto atenda às necessidades da criança sem qualquer tipo de risco (50).

A pasteurização provoca, além das perdas acima relatadas, redução nas quantidades médias de lipídios. Estudo realizado no BLH do Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) mostrou que o leite cru apresentou média de 3,26% de lipídios, enquanto o leite pasteurizado apresentou média de 2,41% no momento da oferta; portanto, uma perda de 26,07%. Evidentemente, houve, também, redução no valor calórico: de 647,80kcal/l (leite cru) para 562,91kcal/l após a pasteurização, conforme trabalho de KAMIYA e RAMOS (155).

Todas essas perdas já eram conhecidas em 1980. Naquele ano, Björkstén et al.(162) publicaram o artigo *Collecting and banking human milk: To heat or not to heat?* onde sugerem, categoricamente, que o leite humano não deve ser pasteurizado. Afirmam, também, que a simples refrigeração a 4°C – 6°C por 72

horas é suficiente para manter o leite isento de desenvolvimento microbiano e, conseqüentemente, sem as perdas ocasionadas pelo processo térmico.

Hamosh et al. (163) avaliaram o efeito do binômio tempo-temperatura na proteólise, lipólise e desenvolvimento bacteriano no leite cru armazenado por curto período de tempo a 15°C, 25°C e 38°C. Os autores concluíram que enquanto a máxima proteólise (40%) ocorreu a 38°C após 24h de armazenamento, a concentração de ácidos graxos aumentou de 440% a 710%, comparado com o leite fresco. Já a multiplicação bacteriana restringiu-se a não patógenos e foi mínima a 15°C durante 24h de armazenamento; baixa a 25°C durante as primeiras 4h a 8h e consideravelmente alta a 38°C durante 4h.

Lepri et al. (164) avaliaram o efeito da pasteurização lenta e do armazenamento a 20°C negativos sobre alguns componentes do leite humano. No que se refere à atividade lipolítica, os autores notaram que houve um aumento com o processo térmico dobrando a concentração de ácidos graxos livres e que a baixa temperatura diminuiu a velocidade da lipólise, embora tenha aumentado com o tempo de armazenamento sob congelamento. A conclusão sobre esse fato é que a pasteurização lenta desnatura parcialmente a lipase e o frio só a desnatura quando a temperatura é menor que 70°C negativos (21).

Outro procedimento que leva a perdas nutricionais é o praticado por algumas unidades de BLH, quando o leite apresenta segunda análise positiva para coliformes totais. Nesse caso, que coincide com o período de escassez do leite humano, ele é repasteurizado e fornecido a não recém-nascidos. Vale ressaltar que esta prática não é preconizada pela FIOCRUZ (165). Assim, para garantir a qualidade do processamento do leite coletado e distribuído pelos BLHs, o Governo Federal criou, em 2003, o Programa Nacional de Controle de Qualidade em Banco de Leite Humano (PNQBLH), ocasião em que os responsáveis pelos bancos de leite tiveram treinamento obrigatório para reciclagem e atualização de seus conhecimentos na área. O programa de reciclagem incluiu o manejo clínico da lactação, processamento e o controle da qualidade do leite humano ordenhado, a assistência em aleitamento materno, a gestão da qualidade em BLH, o processo de informação e comunicação e a alimentação de recém-nascidos prematuros e de baixo peso (143).

3. HIPÓTESE

O leite humano é frequentemente tratado termicamente (pasteurização) nos Bancos de Leite Humano (BLH) para reduzir a contaminação bacteriana, especialmente de patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* hemolíticos do grupo B. No entanto, o calor também pode causar mudanças químicas e biológicas indesejáveis no leite humano, como a redução de vitaminas hidrossolúveis (folacina, C, B₆), redução das propriedades imunológicas, inativação de enzimas, alteração na fração lipídica (166). Nesse último caso, não há consenso. Alguns autores concluem que a pasteurização e o congelamento afetam o conteúdo lipídico e seu perfil de ácidos graxos, enquanto outros concluem que isto não acontece ou que a alteração é mínima (164, 166).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do calor e do congelamento sobre a fração lipídica do leite humano pasteurizado, durante oito meses sob congelamento a -18°C.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Identificar e quantificar, por cromatografia gasosa, ácidos graxos nas amostras de leite humano obtidas após ordenha, pasteurização e congelamento, referentes aos tratamentos estabelecidos para o estudo.

4.2.2. Caracterizar, por espectroscopia infravermelha, grupos funcionais dos ácidos graxos nas amostras de leite humano obtidas após ordenha, pasteurização e congelamento, referentes aos tratamentos estabelecidos para o estudo.

4.2.3. Caracterizar, por ressonância magnética nuclear de hidrogênio, a estrutura e a presença de ácidos graxos nas amostras de leite humano obtidas após

pasteurização e congelamento, referentes aos tratamentos estabelecidos para o estudo.

5. METODOLOGIA

5.1. PESQUISA

A pesquisa foi de natureza quantitativa porque foi caracterizada pelo uso da quantificação na coleta e no tratamento das informações por meio de técnicas estatísticas, e exploratória por proporcionar maior familiaridade com o problema com vistas a torná-lo mais explícito (167, 168).

5.2. AMOSTRAGEM

Por conveniência, foi selecionado o Banco de Leite Humano (BLH) do Hospital Universitário de Brasília (HUB) devido ao fato das unidades acadêmicas envolvidas nessa pesquisa pertencerem à Fundação Universidade de Brasília.

A amostra de LH foi doada ao projeto de forma individualizada (doadora única), sem qualquer tipo de identificação, em data posterior à aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP-FM 072/2005, de 20/12/2005).

A amostra doada ao BLH do HUB, e posteriormente a este projeto, foi descongelada e pasteurizada. Dessa amostra foram retiradas duas frações: uma de leite cru e outra de leite recém-pasteurizado. O restante foi fracionado, colocado em oito frascos de vidro âmbar e congelado para posterior análise. Todo o processo foi realizado no próprio BLH de acordo com as Normas Técnicas para Bancos de Leite Humano (169).

As análises ocorreram no período entre março de 2007 a janeiro de 2009 e, para a composição das amostras, foram utilizadas 10 referências para identificar o tipo de tratamento a que o LH foi submetido: LC – amostra de leite cru; T0, amostra de leite após a pasteurização; T30, amostra de leite após pasteurização e

congelamento por 30 dias; T60, amostra de leite após pasteurização e congelamento por 60 dias; T90, amostra de leite após pasteurização e congelamento por 90 dias; T120, amostra de leite após pasteurização e congelamento por 120 dias; T150, amostra de leite após pasteurização e congelamento por 150 dias; T180, amostra de leite após pasteurização e congelamento por 180 dias; T210, amostra de leite após pasteurização e congelamento por 210 dias e T240, amostra de leite após pasteurização e congelamento por 240 dias; com 3 repetições para cada referência, totalizando 30 frações de amostras de LH. O volume total das amostras foi de 240 mL. A temperatura durante o armazenamento sob congelamento foi de 18°C negativos.

5.3. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

As etapas de preparo das amostras foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) da Universidade de Brasília (UnB), enquanto as análises por cromatografia gasosa, por espectroscopia no infravermelho e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química (IQ-UnB).

5.3.1 Extração de lipídios totais e esterificação (metilação) dos ácidos graxos

A extração de lipídios totais foi feita no Laboratório de Análise de Alimentos da FAV-UnB pelo método butirométrico de Gerber – Van Gulik, conforme BRASIL (170).

O método consiste em separar a gordura do leite existente na forma de glóbulos emulsionados por membrana composta por fosfolipídios, proteínas e água de hidratação, que evitam sua coalescência. Para a determinação completa do teor de gordura, essa camada deve ser destruída, o que se consegue pela ação do ácido sulfúrico que oxida e hidrolisa seus componentes orgânicos. A gordura liberada é separada por centrifugação, facilitada pela adição de álcool amílico que evita a

carbonização dos açúcares pelo calor e ácido sulfúrico, dificultando a leitura do teor de gordura. O resultado é uma linha divisória entre a gordura e a solução ácida, cujo teor é lido na haste do butirômetro diretamente em porcentagem (171).

A metilação, feita segundo Christie (30), tem a função de transformar os ácidos graxos livres em metil-ésteres, o que facilita sua volatilização na coluna do cromatógrafo. Todas as análises cromatográficas foram realizadas em triplicata, após a extração dos lipídios totais.

Materiais usados:

Balança analítica eletrônica AEL-200 CG Libror, Marca Instrumentos Científicos CG Ltda, capacidade 200g (Precisão 0,1mg)

Banho-maria marca Tecnal, modelo TE-057

Agitador mecânico vortex

Tubos de ensaio com tampa rosqueável

Centrífuga marca ITR, modelo SBT, n.º177

Pipetas graduadas de 1mL, 2mL, 5mL, 10mL e 11mL.

Butirômetro de Gerber

Pipetas de Pasteur

Tubo de vidro com capacidade volumétrica de 2mL, com tampa rosqueável.

Microsseringa Hamilton com capacidade para 10µL.

Cromatógrafo gasoso Varian Star 3400cx com detector DIC.

Reagentes:

Álcool amílico PA – Vetec

Ácido sulfúrico PA - Vetec

Hidróxido de potássio (KOH) PA - Vetec

Trifluoreto de boro (BF₃),14% em metanol (Sigma)

Cloreto de sódio (NaCl) PA – (Vetec)

Hexano PA – (Vetec)

Metanol PA – (Vetec)

Gás nitrogênio (White Martins, Brasil)

Padrão de ácidos graxos Supelco 37 component FAME mix (Supelco[®], USA): ésteres metílicos dos ácidos graxos: butírico (4%wt), caproico (4%wt), caprílico (4%wt),

cáprico (4%wt), undecanoico (2%wt), láurico (4%wt), tridecanoico (2%wt), mirístico (4%wt), miristoleico (2%wt), pentadecanoico (2%wt), pentadecenoico-10*cis* (2%wt), palmítico (6%wt), palmitoleico (2%wt), heptadecanoico (2%wt), heptadecenoico-10*cis* (2%wt), esteárico (4%wt), oleico (4%wt), elaídico (2%wt), linoleico (2%wt), linolelaídico (2%wt), γ -linolênico (2%wt), α -linolênico (2%wt), araquídico (4%wt), eicosanoico-11*cis* (2%wt), eicosadienoico-11,14*cis* (2%wt), eicosatrienoico-8,11,14*cis* (2%wt), eicosatrienoico-11,14,17*cis* (2%wt), araquidônico (2%wt), eicosapentenoico-5,8,11,14,17*cis* (2%wt), heneicosanoico (2%wt), behêmico (4%wt), erúxico (2%wt), docosadienoico-13,15*cis* (2%wt), docosahexadienoico-4,7,10,13,16,19*cis* (2%wt), tricosanoico (2%wt), lignocérico (4%wt), nervônico (2%wt).

Procedimentos

Em butirômetros de Gerber, foram adicionados 10mL de ácido sulfúrico PA ($D=1,82$ g/mL), 11mL de leite e 1mL de álcool amílico PA. Após agitação até completa dissolução do coágulo formado, os butirômetros foram centrifugados a 1.100 rpm, durante 5 minutos, e lidos os teores de gordura.

Em seguida, alíquotas de 20mg de lipídios foram transferidas para um tubo de ensaio com tampa rosqueável, para a esterificação dos ácidos graxos. Esse processo transforma os ácidos graxos livres em metil-ésteres, facilitando a sua volatilização na coluna do cromatógrafo. Ao tubo de ensaio, foi adicionado 1,5mL de uma solução de hidróxido de potássio 0,5N em metanol para a saponificação dos ácidos graxos, agitado em agitador vortex por 1 minuto e, em seguida, a mistura resultante foi colocada em banho-maria a 70°C por 5 minutos e resfriada imediatamente em água corrente.

Após o resfriamento, foram adicionados 2mL de solução de trifluoreto de boro (BF_3 , PA), 14% em metanol, seguido de nova agitação mecânica em vortex por 1 minuto, aquecimento em banho-maria a 70°C por 5 minutos e resfriamento imediato em água corrente. O BF_3 catalisa a metilação ao transferir o grupo metil do metanol para o ácido graxo formando um éster metílico de ácido graxo.

Na sequência, à mistura foram adicionados 2,5mL de solução de cloreto de sódio saturado e 1mL de hexano (PA), seguida de centrifugação por 10 minutos a 1200rpm. A solução de cloreto de sódio saturada facilita a separação dos lipídios devido à diferença de densidade das fases líquidas; já o hexano extrai os ácidos graxos da fase metanólica, formando o sobrenadante.

O sobrenadante foi recolhido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferido para outro tubo de vidro com capacidade volumétrica de 2mL, com tampa rosqueável, septo de alumínio e atmosfera saturada de nitrogênio. As amostras foram armazenadas sob congelamento a 18°C negativos até o momento das análises por cromatografia gasosa, por espectroscopia no infravermelho e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

5.3.2 Análise Cromatográfica

O termo “cromatografia” foi utilizado, pela primeira vez, em 1906 pelo botânico russo Mikhail Semenovich Tswett, que desenvolveu uma técnica de adsorção para separar pigmentos de folhas, em 1903. Nos anos seguintes ele aperfeiçoou a técnica que passou a ser chamada de cromatografia (*chrom* = cor e *graphie* = escrita) (172). A cromatografia foi praticamente ignorada até a década de 30, quando foi redescoberta. A partir daí, diversos trabalhos na área possibilitaram seu aperfeiçoamento e, em conjunto com os avanços tecnológicos, levaram-na a um elevado grau de sofisticação que resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas. Assim, surgiram várias técnicas cromatográficas baseadas na classificação da fase móvel (173).

A Cromatografia Gasosa (CG), na qual a fase móvel é um gás, é uma técnica que permite a separação e análise de misturas de substâncias voláteis. Após ser vaporizada, a amostra é arrastada por um fluxo de gás adequado denominado de fase móvel (FM) ou gás de arraste. Esse fluxo gasoso contendo a amostra vaporizada passa por um tubo (coluna cromatográfica) que contém a fase estacionária (FE), onde é feita a separação da mistura. A FE pode ser um sólido adsorvente (Cromatografia Gás-Sólido), um filme de um líquido pouco volátil

suportado sobre um sólido inerte (Cromatografia Gás-Líquido com Coluna Empacotada ou Recheada) ou sobre a própria parede do tubo (Cromatografia Gasosa de Alta Resolução). As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas no gás de arraste e passam por um detector de ionização de chama (DIC), onde são queimadas formando íons que são coletados por eletrodos, gerando uma corrente elétrica que é convertida em voltagem proporcional à quantidade de material eluído. O sinal elétrico é amplificado e seu registro, em função do tempo, é o cromatograma, e as substâncias se expressam como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa (174, 175,176). A Figura 8 mostra um esquema de cromatógrafo a gás com seus componentes básicos.

A determinação dos ácidos graxos metilados foi feita em cromatógrafo a gás, modelo Varian Star 3400cx, com detector DIC e injetor *split/splitless*. Para a separação dos ácidos graxos usou-se a coluna capilar de sílica fundida SPTM-2380 (30m x 0,25mm x 0,2µm) de baixa polaridade, marca Supelco, conforme Christie (30).

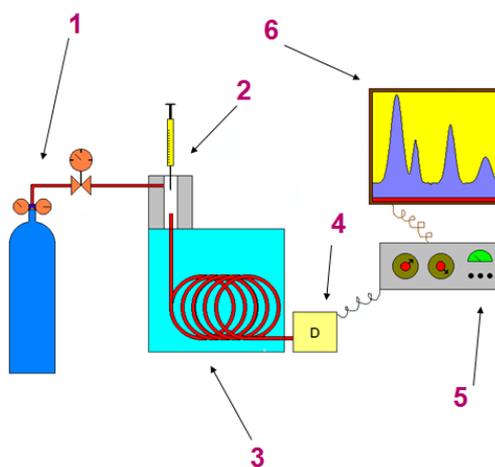


Figura 8 – Componentes básicos de um cromatógrafo gasoso: (1) cilindro de gás de arraste e controles de vazão/pressão; (2) injetor; (3) coluna cromatográfica e forno da coluna; (4) detector; (5) de Tratamento (Amplificação) de Sinal (6) registrador de sinal (173, 176)

As condições cromatográficas foram: temperatura do injetor e do DIC igual a 260°C; temperatura inicial da coluna igual a 140°C, programada para aumentar em 5°C a cada minuto até atingir a temperatura de 240°C após 30 minutos de corrida

cromatográfica, considerando 10 minutos adicionais de limpeza da coluna com hexano (5 minutos antes da injeção da amostra e 5 após a corrida cromatográfica). Como gás de arraste foi utilizado o nitrogênio, com vazão de 20mL/minuto, e o volume de amostra injetado foi de 1,0 μ L usando uma seringa Hamilton de 10 μ L. Os gases de combustão foram hidrogênio e oxigênio medicinal. O tempo total da análise foi de 30 minutos e os resultados foram expressos em percentual em relação à área dos ácidos graxos totais.

A identificação dos ácidos graxos foi feita por comparação com o tempo de retenção do padrão de ácidos graxos Supelco 37 component FAME mix (Supelco[®], USA).

5.3.3 Análise por espectroscopia no infravermelho (IV)

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica muito utilizada pela química orgânica para a identificação de grupos funcionais da amostra em análise, uma vez que tais grupos absorvem frequências características da radiação IV.

As posições de absorção no IV são, geralmente, mostradas como número de ondas ($\bar{\nu}$) ou comprimentos de onda (λ). O número de ondas define o número de ondas por unidade de comprimento; portanto, é diretamente proporcional à frequência, assim como à energia absorvida no IV. Sua unidade é o cm^{-1} . A frequência é, assim, o número de ciclos de ondas que passam por um ponto em um segundo; sua medida é em Hertz, onde $1\text{Hz} = 1\text{ciclo/seg}$.

Ao contrário, os comprimentos de ondas são inversamente proporcionais às frequências e suas energias associadas; ou seja, são os comprimentos de ciclos de ondas completos, medidos em centímetro (177).

A radiação IV compreende parte do espectro eletromagnético de radiações (Figura 9) com número de ondas entre 13.000cm^{-1} e 10cm^{-1} , ou comprimentos de onda de $0,78\mu\text{m}$ a $1000\mu\text{m}$, e está limitada pelo final vermelho da região visível de altas frequências e a região das micro-ondas, de baixas frequências (177). No entanto, a porção do IV mais útil para a análise de compostos orgânicos está

compreendida entre 4000cm^{-1} e 400cm^{-1} ($2,5\ \mu\text{m}$ e $25\ \mu\text{m}$) e frequência variando de $1,9 \times 10^{13}$ a $1,2 \times 10^{14}\text{Hz}$, correspondendo ao IV médio ou região fundamental.

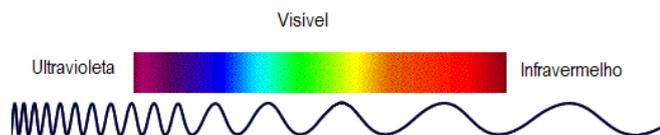


Figura 9 – Parte do espectro eletromagnético de radiações (177)

Os fótons de energia nessa parte do IV (1kcal/mol a 15kcal/mol) não são capazes de excitar elétrons, mas induzem excitação vibracional dos átomos e grupamentos ligados covalentemente.

As ligações covalentes nas moléculas não são rígidas; ao contrário, podem ser esticadas ou dobradas, além da possibilidade de rotação dos grupos em torno de ligações simples. Conseqüentemente, todas as moléculas orgânicas experimentam uma grande variedade de movimentos vibracionais característicos dos átomos que as compõem; a energia para esses movimentos é a correspondente à absorvida da radiação infravermelha incidente na amostra em análise e convertida em energia vibracional. Nesse processo, são absorvidas as frequências do IV compatíveis com a frequência vibracional natural da molécula em questão e a energia absorvida serve para aumentar a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações moleculares. No entanto, somente as ligações que apresentam momento dipolar que mudam em função do tempo são capazes de absorver radiação IV; isto é, a ligação deve apresentar dipolo que muda na mesma frequência da radiação incidente para que a energia possa ser transferida. Assim, as ligações simétricas, como do H_2 ou Cl_2 , e as que possuam ligações simétricas com grupamentos idênticos – ou quase – em cada terminação não absorverão radiação IV. Desse modo, a técnica permite a obtenção de espectros de absorção de compostos que refletem a sua estrutura molecular única (178).

A radiação é produzida por um filamento aquecido, usualmente um filamento de Nernst, que emite radiação na região do IV quando aquecido a altas temperaturas, alcançando entre 1.000°C e 1.800°C . O filamento de Nernst é

constituído de óxidos de zircônio, tório e cério, e fornece energia máxima de radiação a aproximadamente 1,4mm e reduz-se de um fator de aproximadamente 1.000 nas regiões de baixa frequência.

O feixe de radiação produzido é dividido por dois espelhos e cada um dos feixes é focalizado em compartimentos contendo a amostra e a referência. A fração de radiação transmitida é comparada no fotômetro, responsável por indicar a diferença de energia entre amostra e referência. O fotômetro também equaliza as energias dos dois feixes através da cunha ótica. Quando os dois feixes são de mesma intensidade, o instrumento está no zero ótico (Figura 10).

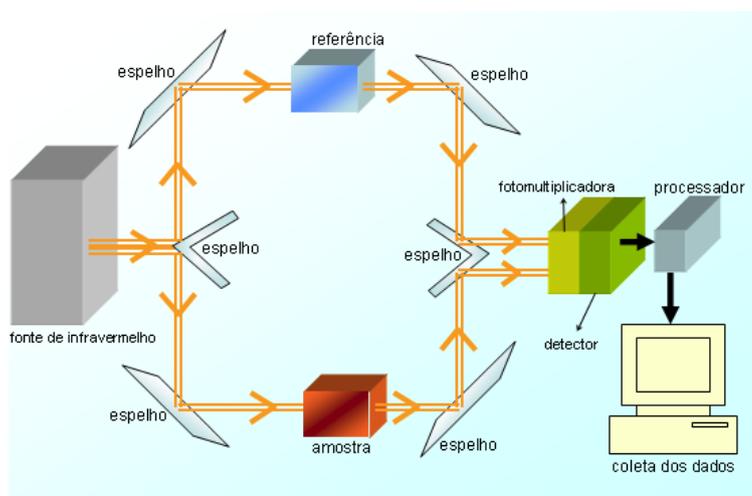


Figura 10 – Esquema de um equipamento de espectroscopia IV.
http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:Aparato_de_espectroscopia_IV.png
Data de acesso: 2008 jul 9

Há dois tipos de vibrações moleculares: estiramento e deformação, podendo ser simétricas e assimétricas; essas últimas também podem ser classificadas como no plano ou fora do plano (179). A Figura 11 mostra os tipos de vibrações moleculares. O sítio a seguir mostra os dois modelos vibracionais de modo não estático:

http://pt.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia_de_infravermelho.

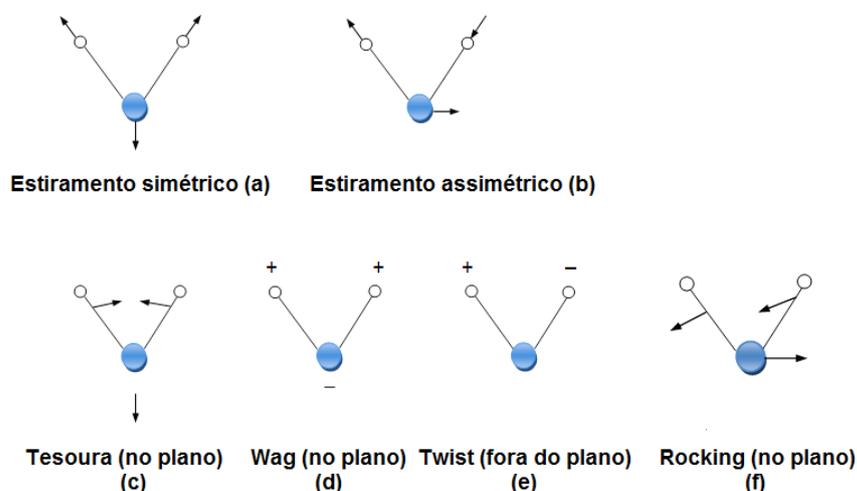


Figura 11 – Tipos de vibrações moleculares. Modificado de (179). (a) e (b) são estiramentos; (c) a (f) são deformações

A análise por espectroscopia no infravermelho foi feita no equipamento Hartmann & Braun, modelo Bomem (Série MB). As amostras foram as mesmas utilizadas na cromatografia gasosa, após evaporação do solvente e colocados como filme em pastilha de cloreto de sódio.

5.3.4 Análise por ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica extremamente importante para a análise estrutural e a quantificação de ácidos graxos e seus derivados. O fenômeno da RMN foi observado pela primeira vez no final de 1945/início de 1946 por Edward M. Purcell, da Universidade de Harvard, e por Felix Block, da Universidade de Stanford. Por suas descobertas, receberam o prêmio Nobel de Física em 1952 e, em 1959, Hopkins e Bernstein publicaram o primeiro trabalho usando a técnica para a identificação de ácidos graxos, ácidos graxos esterificados e ácidos graxos (triglicerídios) em óleos naturais (180, 181).

A matéria é feita de átomos, e estes de elétrons e núcleos. Os núcleos têm quatro propriedades físicas importantes: massa, carga elétrica, magnetismo e *spin* (ou momento angular). A massa do núcleo é a principal responsável pela massa da matéria; a carga nuclear é responsável pelas interações eletrostáticas que mantêm

átomos e moléculas ligados. O magnetismo do núcleo – fraco e de pouca significância para a estrutura molecular – significa que ele interage com campos magnéticos, como uma pequena barra magnética; o *spin* indica que o núcleo atômico se comporta como se estivesse girando no espaço, como um minúsculo planeta (182).

O núcleo magnético interage com campos magnéticos. Estes podem ter origem no ambiente molecular (por exemplo, os elétrons circundantes), outros *spins* nucleares da mesma molécula, ou de fontes externas, como os gerados por espectrômetros.

A RMN envolve manipulações nos *spins* nucleares. Objetos em movimento possuem uma propriedade chamada *momento angular*, que pode ser visualizado como um vetor apontando no sentido do eixo em volta do qual o objeto gira. De acordo com a mecânica quântica, o momento angular é quantizado e o momento angular total de uma molécula determina quão rápido ela está girando, mas não informa sobre o eixo de rotação.

O *spin* também é uma forma de momento angular. Entretanto, não é produzido pela rotação da partícula; é uma propriedade intrínseca da partícula.

Todos os núcleos carregam uma carga e, em alguns, a carga gira em torno do eixo nuclear gerando um dipolo magnético ao longo do eixo e uma órbita de precessão, quando submetido a um campo magnético (B_0), em analogia com um pião sob a influência do campo gravitacional (Figura 12 a,b). O momento magnético do *spin* (μ) pode ser descrito em termos de número de *spins* (I): 0, $\frac{1}{2}$, 1, $\frac{3}{2}$ e assim por diante. $I = 0$ significa nenhum *spin*, ou seja, os números de prótons e nêutrons são ambos pares; é o caso do ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S , que não têm propriedades magnéticas. Se os números de prótons mais o de nêutrons forem ímpares, o núcleo terá números de *spins* fracionários, como no caso do ^1H ($I=\frac{1}{2}$); se os números de prótons e nêutrons forem ambos ímpares, os números de spin serão inteiros, como no ^{14}N ($I=1$). Nesses dois últimos casos os campos magnéticos gerados podem ser detectados por RNM (179, 183).

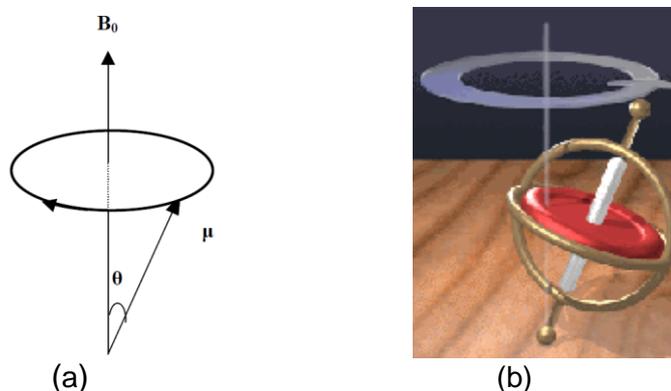


Figura 12 – Geração de dipolo magnético por uma carga nuclear (a) e analogia com um pião sob influência de um campo gravitacional (b) (181, 184, 185)

Considerando o espectro eletromagnético, a RMN está na região das ondas de rádio (radiofrequência-RF) e, quando aplicado um campo magnético sob determinadas condições, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região da RF. Um campo magnético alto e homogêneo faz com que os *spins* nucleares assumam determinadas orientações, assim calculadas:

$$\text{Número de orientações possíveis} = 2I + 1,$$

sendo I = número de *spins* (183).

Assim, no caso do ^1H ($I=1/2$) há duas orientações possíveis: uma parcialmente na mesma direção do campo magnético e outra parcialmente contra (Figura 13).

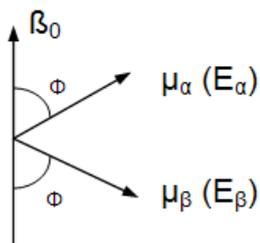


Figura 13 – Direções dos spins submetidos a um campo magnético B_0 (Adaptado de 183)

Uma vez que a RMN é proveniente da interação da radiação eletromagnética com a matéria (amostra), para que ela seja observada deve-se aplicar outro campo magnético (B_1) perpendicularmente ao primeiro (B_0) na região da radiofrequência.

Isso é necessário para que ocorram as transições entre os níveis de menor energia e o de maior energia, e a consequente absorção de energia perturbando e retirando o sistema do estado de equilíbrio (186).

O campo B_1 é aplicado na forma de um pulso de RF e permanece ligado durante microssegundos (μs) a milissegundos (ms); assim, alguns núcleos que estavam em equilíbrio absorvem a energia do pulso gerando a perturbação. Quando o pulso é desligado, o sistema tende a voltar ao estado de equilíbrio original, ou *processo de relaxação*, e, para isso, os núcleos perdem o excesso de energia gerando os sinais de RMN (sinais de *Free Induction Decay* – FID) que são então detectados. Considerando que há vários núcleos em uma amostra, são gerados vários sinais de FID que se superpõem. Para torná-los acessíveis, os sinais são convertidos matematicamente (transformada de Fourier), do domínio do tempo para o domínio das frequências características de cada núcleo, originando um espectro de RMN em diferentes frequências que podem ser representadas por meio dos deslocamentos químicos (δ), que são determinados por meio da razão dessas frequências observadas pela frequência do equipamento, expressos em ppm (parte por milhão) (187).

Diferentemente da RMN, que requer maior tempo (10^{-3}s) e provoca a mudança de orientação do spin, a espectroscopia do IV é praticamente instantânea (10^{-13}s) e causa alteração no estado vibracional da molécula em análise (187).

A ressonância nuclear magnética de hidrogênio (RMN ^1H) foi realizada em espectrômetro Varian Mercury plus (300MHz, 7,05T). As amostras foram as mesmas utilizadas na cromatografia gasosa, apenas substituindo-se o solvente (hexano) por clorofórmio deuterado 99,8% (CDCl_3), Sigma-Aldrich®.

5.3.5. Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados obtidos considerou o método de análise e o tempo em que a amostra foi retirada do banco de leite. Foram três repetições em um delineamento inteiramente casualizado. A análise de variância para a quantidade de cada ácido graxo foi feita usando medidas repetidas no tempo e, quando houve

efeito significativo ($P < 0,05$) sobre o fator tempo, foi realizada análise de regressão linear. Também foi feita análise de componentes principais.

As análises estatísticas foram feitas no programa SAS[®] V. 9.1.3 (SAS, Cary Indiana, 2003).

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Inicialmente, em triplicata, injetou-se 1 μL da solução dos padrões individuais dos ésteres dos ácidos graxos cáprico, láurico, mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, *ZZ*-linoleico, *ZE*-linoleico, linolênico e araquídico para identificar os seus respectivos tempos de retenção. A escolha desses ácidos graxos foi em função das áreas cromatográficas: picos com áreas menores que 1000 não apresentaram boa resolução para identificar esses componentes orgânicos. Assim, selecionaram-se os 11 ácidos graxos descritos acima que apresentaram áreas maiores que 1000, por estarem presentes em maior concentração.

Em seguida foi preparada uma solução de 500mg/L contendo os mesmos ácidos graxos (solução mãe) e posteriores diluições para concentrações de 10mg/L, 25mg/L, 50mg/L, 100mg/L, 225mg/L e 500mg/L. A partir dessas diluições, foi injetado, em triplicata, 1 μL de cada diluição para traçar a curva de calibração e a equação de regressão para cada ácido graxo (Apêndice A, pg. 45).

Realizada essa etapa, 1 μL , em triplicata, das amostras de leite humano, obtidas conforme a metodologia descrita no item 5.2, foi injetado no cromatógrafo.

A partir dos dados de tempos de retenção e equações de regressão foram calculadas as concentrações dos ácidos graxos nas amostras.

Considerando o ácido araquídico ($\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$) como exemplo, os cálculos, para a amostra de leite humano cru (LC), foram assim efetuados:

Peso de gordura = 20mg; diluição para 1,5mL (considerou-se que 1,5mL = 1,5mg). Portanto, em 1 μL (volume injetado):

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em virtude dos valores referentes aos tratamentos T30 e T60 não terem sido coerentes, outra esterificação foi realizada obtendo-se os mesmos resultados. Isso, provavelmente, pode ser explicado por uma incompleta reação de esterificação e, por isso, os resultados obtidos foram desprezados.

7.1 CROMATOGRAFIA GASOSA

7.1.1 Ácidos Graxos Saturados

Os dados obtidos para a concentração dos ácidos graxos saturados nas amostras analisadas indicam que houve variações, maiores ou menores, para as concentrações de todos os ésteres de ácidos graxos analisados nos respectivos tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentração de ácidos graxos saturados nas amostras de leite humano, para os tratamentos LC, T0, T90, T120, T150, T180, T210, T240 (mg%±DP%).

Tratamentos	Ácido cáprico	Ácido láurico	Ácido mirístico	Ácido palmítico	Ácido esteárico	Ácido araquídico
LC	0,1740±0,0653	0,2413±0,0381	0,5007±0,0800	2,6926±0,3440	0,7799±0,0948	0,0466±0,0028
T0	0,1605±0,0275	0,3373±0,0247	0,7416±0,0475	4,5001±0,2754	1,2898±0,0818	0,1008±0,0052
90	0,0313±0,0183	0,3069±0,0521	0,5805±0,0809	2,3471±0,4180	0,5679±0,1601	0,0334±0,0063
T120	0,1818±0,0811	0,4990±0,0428	0,8496±0,0631	3,5613±0,2304	0,3901±0,0255	0,0475±0,0020
T150	0,1354±0,0247	0,4859±0,0543	0,8777±0,0805	3,6718±0,3178	0,9401±0,0906	0,0517±0,0029
T180	0,1149±0,0280	0,4340±0,0679	0,7171±0,1055	2,9540±0,4210	0,7741±0,1113	0,0369±0,0039
T210	0,0873±0,0325	0,4788±0,0603	0,7928±0,0655	3,2575±0,2121	0,8479±0,0567	0,0424±0,0012
T240	0,0873±0,0107	0,4113±0,0271	0,7809±0,0358	3,5979±0,2392	0,9795±0,0610	0,0469±0,0028

DP = desvio padrão (P<0,05).

Os ésteres dos ácidos graxos cáprico e láurico apresentaram regressões quadráticas, enquanto o araquídico, o esteárico e o mirístico regressões lineares (Figuras 14 e 15), ambas significativas. Os ácidos esteárico e palmítico não mostraram regressões significativas (Figuras 15 e 16).

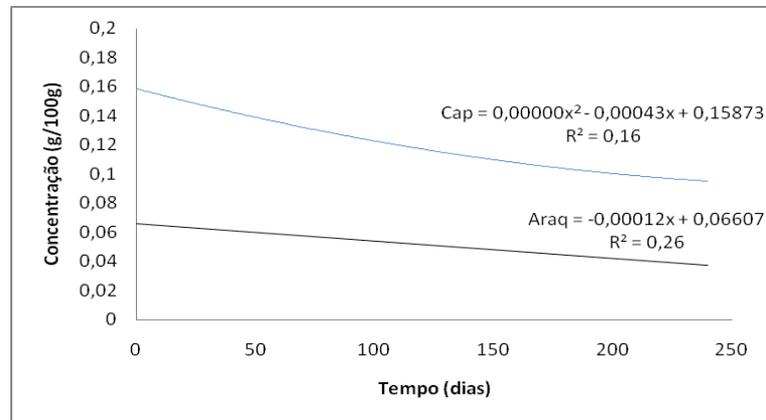


Figura 14 – Regressões dos ácidos cáprico (Cap) e araquídico (Araq)

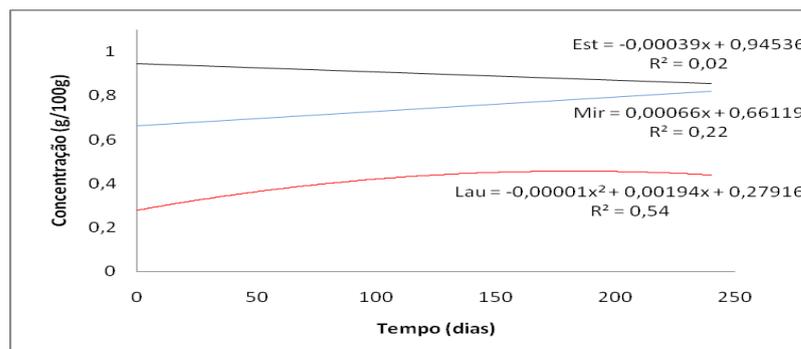


Figura 15 – Regressões dos ácidos esteárico (Est), mirístico (Mir) e láurico (Lau)

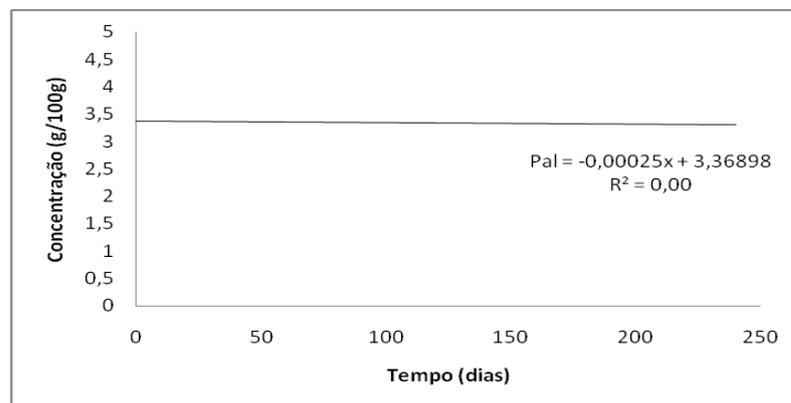


Figura 16 – Regressão do ácido palmítico (Pal)

A concentração de ácido cáprico praticamente se manteve constante entre os tratamentos LC e T0; no entanto, em relação ao tratamento T90 os dados obtidos indicam uma redução de $0,1740 \pm 0,0653$ (LC) para $0,0313 \pm 0,0183$ (T90). A Figura 14 mostra que o coeficiente de determinação foi baixo ($r^2 = 0,16$); assim, o coeficiente

de correlação foi $r = 0,4$ e, portanto, 40 % da variação na concentração desse ácido estão relacionadas com o tempo. Pelo coeficiente de determinação observa-se que a variação na concentração desse ácido graxo (16%) pode ser explicada pelo modelo estatístico aplicado; portanto, 84% variam em função de outros fatores não explicados pelo modelo.

Para a fração do ácido láurico, houve aumento de sua concentração após a pasteurização; o mesmo ocorreu durante os demais tratamentos. No entanto, a regressão quadrática (Figura 15) mostra que a concentração tende a manter-se constante com o tempo. Com relação ao ácido mirístico, observa-se que houve tendência de aumento da concentração com o tempo, sendo essa relação de 47%. Para o ácido esteárico houve pequena tendência de redução na sua concentração com relação ao tempo (14%) (Figura 15). O mesmo ocorreu para o ácido araquídico, com tendência de redução e 51% de relação com o tempo (Figura 14).

Pesquisas sobre leite humano demonstraram que, no caso do leite cru, há hidrólise de lipídios catalisada por lipase dependente de sais biliares e que ela é inativada pela pasteurização (158, 166, 188). No entanto, deve-se considerar a possível hidrólise de lipídios por enzimas microbianas (mais resistentes ao processo térmico) e a posterior oxidação de ácidos graxos por enzimas microbianas ou por processo químico (catalisado pela luz). A pasteurização lenta, segundo Goldblum et al. (188), inativa parte da lipase mas ainda permite hidrólise parcial de lipídios e liberação de ácidos graxos.

7.1.2 Ácidos Graxos Insaturados

As concentrações dos ácidos graxos insaturados estão mostradas na Tabela 5. Verifica-se, como para os ácidos graxos saturados, que houve alterações nos perfis de ácidos graxos insaturados, porém com tendência de aumento nas suas concentrações, exceto para o ácido linolênico que sofreu redução.

Tabela 5 – Concentração de ácidos graxos insaturados nas amostras de leite humano, para os tratamentos LC, T0, T90, T120, T150, T180, T210, T240 (mg% ± DP%)

Tratamentos	Ácido palmitoleico	Ácido oleico	Ácido linoleico (ZZ)	Ácido linoleico (ZE)	Ácido linolênico
LC	0,2757±0,0338	3,5132±0,4176	1,1375±0,1384	0,0471±0,0063	0,0593±0,0071
T0	0,3763±0,0219	5,9298±0,3727	4,2389±0,2516	0,0810±0,0079	0,0429±0,0019
T90	0,2758±0,0444	2,9796±0,5987	0,8206±0,2022	0,0513±0,0206	Nd
T120	0,3901±0,0255	4,3029±0,2592	0,8368±0,0411	0,0793±0,0029	0,0252±0,0002
T150	0,4469±0,0341	5,1995±0,3874	1,8560±0,1349	0,1089±0,0097	Nd
T180	0,3244±0,0456	3,6860±0,5214	1,2423±0,1756	0,0880±0,0106	0,0492±0,0083
T210	0,4033±0,0271	4,4580±0,3058	1,5919±0,1082	0,0911±0,0087	0,0619±0,0018
T240	0,3485±0,0158	4,3102±0,3365	1,1793±0,1494	0,1132±0,0401	0,0271±0,0021

DP = desvio padrão (P<0,05). Nd = não detectado

A análise estatística mostrou que apenas o ácido *ZZ*-linoleico apresentou regressão linear quadrática significativa (Figura 17). Para o ácido *ZE*-linoleico a regressão foi linear significativa (Figura 18). Os ácidos palmitoleico, oleico e linolênico não apresentaram regressão significativa (Figuras 17 e 18).

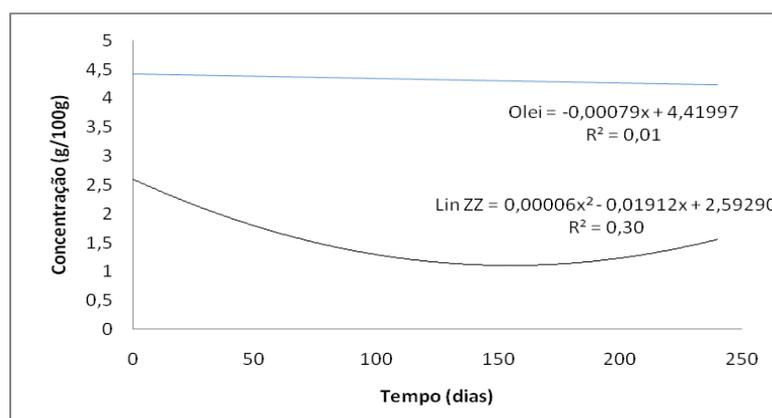


Figura 17 – Regressão dos ácidos oleico (Olei) e *ZZ*-linoleico (Lin *ZZ*)

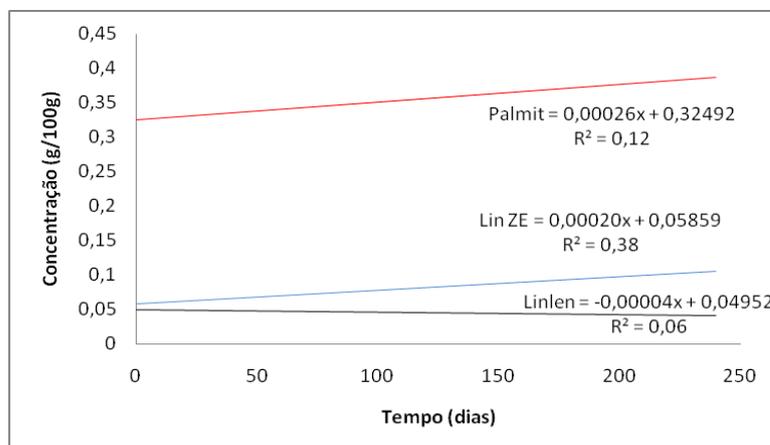


Figura 18 – Regressão dos ácidos palmitoleico (Palmit); ZE-linoleico (LinZE) e linolênico (Linlen)

Fidler *et al.* (166) avaliaram os efeitos da pasteurização e da esterilização sobre os teores de lipídios e ácidos graxos do leite humano; concluíram que a pasteurização lenta (63°C/30 minutos) não altera o teor de lipídios disponíveis, nem sua composição. Por outro lado, a esterilização a 120°C/30 minutos reduz o teor em aproximadamente 13% e pode provocar pequenas reduções nas concentrações dos ácidos linoleico e araquidônico sem, no entanto, considerá-las significativas. Contudo, esses dois processos podem ainda induzir perda de lipídios insaturados por oxidação, tanto na presença de oxigênio quanto de luz. Em outro trabalho, Romeu-Nadal, Castellote e López-Sabater (189) concluíram que tanto a pasteurização lenta (62,5°C/30 min) quanto a rápida (100°C/5 min) não alteraram a concentração de ácidos graxos, inclusive dos insaturados de cadeia longa. Também foi observado que o armazenamento do leite cru a 4°C até 96h, a -20°C até 12 meses e a -80°C até 12 meses não alteraram significativamente o perfil de ácidos graxos saturados e insaturados.

Henderson, Fay e Hamosh (158) avaliaram somente o efeito da pasteurização e concluíram que os ácidos graxos de cadeia longa não foram afetados pelo processo térmico e isso, provavelmente, se deveu a alta atividade antioxidante do leite humano. No experimento, foram usadas duas amostras de leite humano: uma, já congelada a -70°C, de doadora com um a três meses de lactação e a outra, da mesma doadora, de leite recém ordenhado e depois congelado a -70°C. Alíquotas foram retiradas após o descongelamento, pasteurizadas a 62,5°C/30 min e

analisadas por cromatografia gasosa com coluna capilar. Por outro lado, Silvestre et al., (2008) avaliaram que o efeito antioxidante do leite materno é bastante afetado pelo processo térmico, principalmente o lento, o que vai de encontro ao exposto por Henderson, Fay e Hamosh (158).

No entanto, Wardell, Hill e D'Souza (191) mostraram que o aquecimento do leite a 62,5°C provocou hidrólise parcial de triglicerídios e que, após 30 minutos (tempo de manutenção), houve significativa redução na concentração de quatro, entre os sete ácidos graxos analisados: mirístico (15%), esteárico(6%), palmítico(8%), oleico(8%). Também foi demonstrado que a porcentagem de ácidos graxos constituintes dos triglicerídios não foi alterada, exceto para o linolenato que teve uma diminuição de 22% na sua concentração após o tratamento térmico. Esses autores também avaliaram a influência de três ciclos sequenciais de congelamento a -20°C e posterior descongelamento à temperatura ambiente sobre os triglicerídios do leite cru. Segundo seus resultados, houve as seguintes perdas: 14% após o 1º ciclo de congelamento/descongelamento para o ácido mirístico e mais 18% após o segundo. Não houve alteração no terceiro ciclo. Tal comportamento foi diferente para as concentrações médias dos ácidos palmítico, esteárico e oleico, que foram reduzidas em 20%-25% após o 1º ciclo de congelamento/descongelamento e permaneceram praticamente constantes após os outros dois ciclos. A maior diferença ocorreu com a fração do ácido linoleico, que sofreu redução de 65% na sua concentração após o segundo ciclo de congelamento/descongelamento. Os mesmos ciclos foram repetidos com congelamento a -196°C e os resultados foram semelhantes.

Ressalte-se que os resultados de Wardell, Hill e D'Souza (191) indicam que, exceto para o ácido mirístico, o decréscimo na concentração de ácidos graxos foi menor no leite submetido à pasteurização do que naquele congelado e descongelado (ainda cru) uma vez. No que diz respeito aos ciclos de congelamento e descongelamento, não foi especificado quanto tempo durou o congelamento, tanto a -20°C quanto a -196°C. Vale lembrar que no trabalho desses autores foram utilizadas técnicas de extração de gordura e condições cromatográficas diferentes das utilizadas neste trabalho.

Lepri et al. (164) também avaliaram o efeito da pasteurização e do armazenamento sobre alguns componentes de uma mistura de leite humano e chegaram às seguintes conclusões: (1) o lapso de tempo entre a coleta do leite e sua pasteurização favoreceu a hidrólise de lipídios em até 0,5%; (2) a pasteurização (62,5°C/30min.) aumentou a atividade lipolítica com aumento de produtos da hidrólise em até 0,9%; (3) o armazenamento, a -20°C por 90 dias, do leite pasteurizado causou hidrólise adicional dos lipídios e pequena redução do teor de triglicerídios, com redução de 6% no teor de gordura; (4) o procedimento total (pasteurização e congelamento/descongelamento) não alterou, substancialmente, a composição percentual de ácidos graxos; (5) os autores sugerem redução no lapso de tempo entre a coleta e a pasteurização, e o uso do leite pasteurizado e congelado no intervalo de cinco semanas para leite humano conservado sob congelamento.

Resultados semelhantes foram obtidos por Fidler et al. (192) quando avaliaram o conteúdo de gordura e a composição em ácidos graxos do leite humano cru e após a pasteurização e a esterilização. Nesse estudo, concluíram que os processos térmicos não afetaram o conteúdo total de lipídios do leite, mas a esterilização pode reduzir sua disponibilidade em mais de 10%. A composição em ácidos graxos não foi alterada pela pasteurização, mas levemente pela esterilização, especificamente dos ácidos linoleico (-0,7%) e araquidônico (-2,5%). Williamson et al., (193) avaliaram o efeito do tratamento térmico na absorção de lipídios e na retenção de cálcio, fósforo, sódio e nitrogênio em bebês entre 3 e 6 semanas alimentados com leite cru, pasteurizado e fervido. Os autores concluíram que a absorção de lipídios do leite cru foi reduzida em um terço após a pasteurização em função da desnaturação de lipases pelo calor; no leite fervido a absorção foi ainda menor. Anderson et al., (194) chegaram à conclusão semelhante: a absorção de lipídios é menor no leite pasteurizado que no leite cru, assim como o ganho de peso e o crescimento de recém nascidos pré-termo.

A gordura é o componente do leite mais suscetível a variações e sua concentração difere durante a lactação, durante o dia, de mãe para mãe e dentro da mesma ordenha (195). Este trabalho teve como premissa acompanhar a sequência operacional do leite humano coletado pelos bancos de leite de doadora única e

avaliar se o processo de pasteurização e de conservação sob congelamento altera, em alguma extensão, o perfil de ácidos graxos.

Nos bancos de leite, adota-se o processo lento de pasteurização; isto é, o aquecimento é feito a 63°C-65°C durante 30 minutos. Em um processo térmico lento pode ocorrer a hidrólise de lipídios liberando ácidos graxos e alterando as suas densidades que, originalmente, são menores que a da água (Tabelas 6 e 7). Isso permite a ascensão de glóbulos de gordura e de ácidos graxos livres presentes no leite. Esses, por sua vez, também podem ser liberados por lipases microbianas que são resistentes ao processo de pasteurização, ao contrário das lipases endógenas, que são desnaturadas.

Tabela 6 – Propriedades físicas de ácidos graxos saturados ^(*)

Ácidos graxos/ Propriedades	Cáprico	Láurico	Mirístico	Palmitico	Esteárico	Araquídico
Densidade ⁽¹⁾	0,893	0,880	0,862	0,865 (a 62°C)	0,847 (a 70°C)	0,824
PF ⁽²⁾ (°C)	31	44-36	58,8	63-64	69,6	75,5
PE ⁽³⁾ (°C)	269	225 (a 100mmHg)	250,5 (a 100mmHg)	351-352; 215 (a 15mmHg)	383	328
FM ⁽⁴⁾	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
M ⁽⁵⁾	172,26g/mol	200,31776	228,37092	256,42g/mol	284,47724	312,5304

⁽¹⁾ g/cm³; ⁽²⁾ ponto de fusão; ⁽³⁾ ponto de ebulição; ⁽⁴⁾ fórmula molecular; ⁽⁵⁾ massa molar;
 (*) Fonte: www.wilipedia.org

Além disso, nos bancos de leite os pasteurizadores não são providos de agitadores mecânicos; ou seja, os recipientes são aquecidos sem agitação constante e, uma vez ou outra, os frascos são agitados manualmente. Esse procedimento possibilita a formação de uma camada de gordura (nata) superficial após o resfriamento. Como nesta pesquisa pretendeu-se obter amostras que representassem os procedimentos rotineiros dos bancos de leite, após a etapa de pasteurização o leite foi distribuído em oito pequenos vidros. Como isso ocorre sem uma técnica apropriada de homogeneização do produto, alguns recipientes podem recebê-lo com maior ou menor teor de gordura. Ademais, é ainda possível considerar algum grau de aderência, maior ou menor, de glóbulos de gordura e de

ácidos graxos livres às paredes internas dos vidros, inclusive após o descongelamento sob aquecimento em banho-maria a 40°C ou mesmo durante as etapas de congelamento/descongelamento. Nesse último caso, os cristais de gelo (maiores e pontiagudos) formados durante o congelamento lento perfuram o glóbulo de gordura liberando ácidos graxos.

Tabela 7 – Propriedades físicas de ácidos graxos insaturados ⁽¹⁾

Ácido/Propriedades	Palmitoleico	Oleico	ZZ-linoleico	ZE-linoleico	Linolênico
Densidade ⁽¹⁾	0,894	0,895 g/mL	0,9 g/cm ³	? ⁽⁶⁾	0,92 g/cm ³
PF ⁽²⁾ (°C)	-0,1	13-14	-5	? ⁽⁶⁾	-11
PE ⁽³⁾ (°C)		360 (a 760mmHg)	229	? ⁽⁶⁾	232
FM ⁽⁴⁾	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
M ⁽⁵⁾	254,408	282,4614g/mol	280,44548g/mol	280,44548	278,43g/mol

⁽¹⁾ g/cm³; ⁽²⁾ ponto de fusão; ⁽³⁾ ponto de ebulição; ⁽⁴⁾ fórmula molecular; ⁽⁵⁾ massa molar; ⁽⁶⁾ não disponível na literatura consultada; (*) Fonte: www.wilipedia.org

Observa-se grande variação, mês a mês, nos perfis de ácidos graxos mostrados nas Tabelas 4 e 5. Deve-se considerar, ainda, que a falta de homogeneidade dos produtos durante as fases de processamento também pode se repetir na distribuição de leite aos recém-nascidos pré-termo que, na essência, são os principais receptores e foco dos bancos de leite humano. Essa observação é relevante porque a distribuição de leite com teor de gordura desuniforme, além de reduzir o aporte calórico, diminui também o fornecimento de ácidos graxos essenciais, precursores hormonais, vitaminas lipossolúveis, ácidos graxos de cadeia longa necessários à acuidade visual, ao desenvolvimento do sistema nervoso e ao funcionamento dos processos cerebrais, precursores de mensageiros químicos, provocando moléstias carenciais.

Segundo Weber et al., (196), a falta de homogeneidade do leite antes do congelamento pode afetar o conteúdo de gordura, assim como as diferentes técnicas de amostragem, uma vez que o leite é primeiramente coletado e congelado, de modo caseiro, pela doadora.

Pela análise dos componentes principais (Figura 19), verifica-se que quando ocorre um aumento na concentração de um ácido graxo; o mesmo se observa para as concentrações dos demais componentes, exceto para o ácido linolênico que não tem efeito no primeiro componente. Isto também pode ter ocorrido pela não homogeneização do leite e conseqüente presença de mais gordura em determinadas frações da amostra aumentando o nível de alguns ácidos graxos.

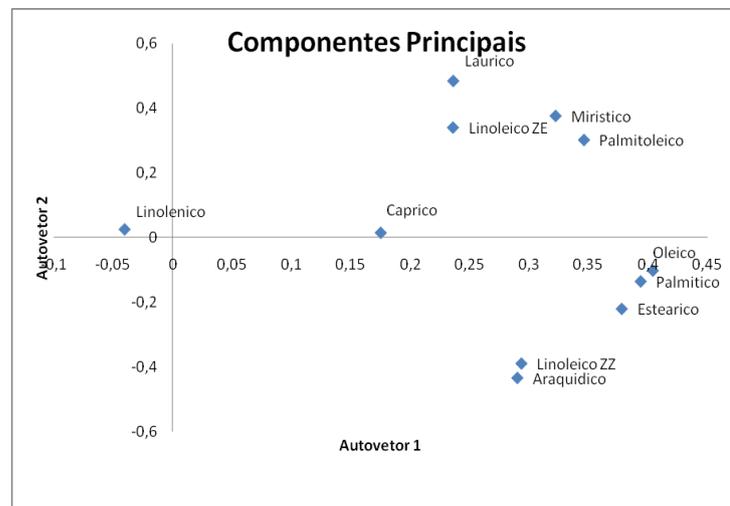


Figura 19 – Primeiros dois componentes principais para ácidos graxos em leite humano

No segundo componente (eixo Y) há um subgrupo de ácidos graxos. Consta-se um aumento nas concentrações dos ácidos láurico, mirístico, palmitoleico e ZE-linoleico e uma redução para os ácidos ZZ-linoleico e araquídico, e vice-versa. Láurico e mirístico são ácidos graxos saturados, enquanto ZE-linoleico (insaturado *trans*) se comporta como um saturado – por ser sólido à temperatura ambiente – e palmitoleico tem cadeia menor que ZZ-linoleico e araquídico. Essa variação pode estar relacionada à dieta materna, que determina a composição de triglicerídios (197) e também dos ácidos graxos do tecido adiposo acumulados durante a gravidez. Nesse contexto, é validado o estímulo ao consumo de carne de pescado para aumentar os níveis de ácidos graxos poli-insaturados, como o DHA, com importante consequência para a saúde do recém-nascido (198). Do mesmo modo, uma dieta mais rica em carboidratos determinará a síntese ‘de novo’ de ácidos graxos, com maior concentração dos saturados de cadeia média (75, 199).

7.2 DADOS ESPECTROSCÓPICOS DE IV

A técnica de IV evidencia as funções orgânicas presentes em derivados ésteres metílicos dos ácidos graxos, conforme demonstrado nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – Bandas de absorção observadas no IV para ácidos graxos saturados e suas atribuições nas amostras de leite humano

Atribuições aos Grupos Funcionais	Cáprico Nº onda cm ⁻¹	Láurico Nº onda cm ⁻¹	Mirístico Nº onda cm ⁻¹	Palmítico Nº onda cm ⁻¹	Esteárico Nº onda cm ⁻¹	Araquídico Nº onda cm ⁻¹
CH ₃ <i>est</i>	2950	2925	2924	2953	2925	2950
CH ₂ <i>est</i>	2855	2854	2854	2850	2849	2887
C=O <i>est</i>	1743	1742	1744	1742	1742	1743
CH ₃ <i>def. ass.</i>	1465	1465	1466	1473	1474	-
CH ₂ <i>def</i>	1436	1436	1436	1464	1463	1463
CH ₃ <i>def. sim.</i>	1363	-	1362	1383	1384	1384
C-O <i>est</i>	1247	1169	1248	1199	1178	1227
CH ₂ <i>def rock</i>	723	-	722	732	720	720

est = estiramento; *def. ass.* = deformação assimétrica; *def. sim.* = deformação simétrica; *def rock* = deformação em rock.

Tabela 9 – Bandas de absorção observadas no IV para ácidos graxos insaturados e suas atribuições nas amostras de leite humano

Atribuições aos Grupos Funcionais	Palm-9 Nº onda cm ⁻¹	Oleico Nº onda cm ⁻¹	ZZ-Linol Nº onda cm ⁻¹	ZE-Linol Nº onda cm ⁻¹	Linolênico Nº onda cm ⁻¹
CH <i>est</i> sp ²	3004	3004	-	3010	3004
CH ₃ <i>est</i>	2926	2925	2950	2926	2929
CH ₂ <i>est</i>	2855	2854	2858	2855	2857
C=O <i>est</i>	1743	1744	1733	1743	1736
CH ₃ <i>est. ass.</i>	1461	1463	1461	1461	1461
CH ₂ <i>def</i>	1436	1436	1438	1436	1439
CH ₃ <i>def. sim.</i>	1361	1360	1366	1360	1366
C-O <i>est</i>	1197	1197	1201	1197	1198
C=CH sp ² E	*	*	*	969	*
CH ₂ <i>def rock</i>	725	723	728	725	-

(*) As frequências vibracionais relativas à dupla ligação *cis* (C=CH sp²Z) não foram assinaladas nos espectros devido à baixa intensidade das respectivas bandas.

As frequências vibracionais de estiramentos (2950cm⁻¹ e 2850cm⁻¹) e deformações (1360cm⁻¹ e 1461cm⁻¹) foram observadas para CH alifáticos (CH₃ e CH₂) de derivados ésteres saturados e insaturados. Apenas nos ácidos graxos oleico, *ZE*-linoleico, linolênico que apresentam as duplas ligações, foi possível

Tabela 11 – Deslocamentos químicos de RMN ^1H dos ácidos graxos insaturados nas amostras de leite humano

Natureza dos hidrogênios caracterizados nos ácidos graxos	Palmitoleico δ (ppm)	Oleico δ (ppm)	Linoleico (ZZ) δ (ppm)	Linoleico (ZE) δ (ppm)	Linolênico δ (ppm)
CH_3	0,88	0,88	0,88	0,88	0,98
$-(\text{CH}_2)_n-$	1,20-1,40	1,20-1,40	1,20-1,40	1,20-1,40	1,20-1,40
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	1,62	1,60	1,61	1,58-1,64	1,62
$-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$	1,98-2,14	1,98-2,04	1,92-2,10*	1,97-2,04	2,01-2,17
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	2,30	2,30	2,31	2,30	2,31
$=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{}$	-	-	2,66-2,80*	2,66-2,72	2,81
$-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	3,67	3,67	3,67	3,67	3,67
$-\text{CH}=\text{CH}-$	5,30-5,40	5,30-5,40	5,34-5,46*	5,37-5,42	5,30-5,45

* Dados citados de acordo com Silverstein, Webster, Kiemle (2005) devido à baixa concentração do ácido linoleico na amostra.

```

2009-34h-Oleato-de-metila
Prof. Sérgio
FAV-UnB
File: home/alunos/vnmrsys/data/gerimario/2009-34h-Oleato-de-metila.fid
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Operator: alunos
File: 2009-34h-Oleato-de-metila
Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 9.025 sec
Width 3601.0 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 300.0673653 MHz
DATA PROCESSING
FT size 95528
Total time 2 min, 45 sec

```

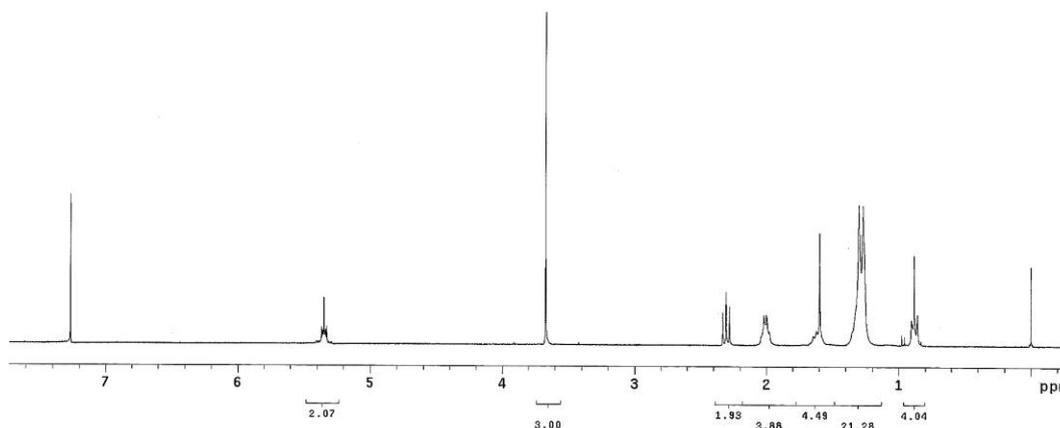


Figura 20 – Integrações das áreas correspondentes aos hidrogênios do oleato de metila ilustradas sob o espectro de RMN ^1H

Os sinais referentes às metilas (CH_3) terminais das cadeias carbônicas saturadas e insaturadas estão entre 0,88ppm e 0,89ppm, com uma única exceção para o derivado linoneato que apresenta a sua metila em 0,98ppm. É comum aos

ácidos graxos a sobreposição dos hidrogênios metilênicos ($-\text{CH}_2$)_n que se mostram com formas diferentes para os picos, dependendo do ácido graxo estudado.

Os sinais dos hidrogênios metilênicos das posições β ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$) e α ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$) ao grupo acila são identificados entre 1,58ppm e 1,64ppm e entre 2,30ppm e 2,31ppm, respectivamente.

Os sinais de ésteres insaturados entre 1,97ppm e 2,17ppm estão relacionados com os hidrogênios metilênicos ligados às duplas ligações, denominados hidrogênios alílicos. Apenas para o *Z*E-linoleato e linolenato há os metilenos entre 2,66ppm e 2,81ppm, denominada posição bisalílica. As metoxilas (CH_3O) absorvem para todos os ácidos graxos em 3,67ppm e os hidrogênios olefínicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$) somente são evidenciados pelos ésteres insaturados entre 5,30ppm e 5,46ppm.

8. CONCLUSÕES

Os resultados cromatográficos e a análise de componentes principais mostraram grande variação na concentração de ácidos graxos da gordura do leite humano analisado neste estudo. Essas variações, que também podem ocorrer no leite armazenado e distribuído pelos BLH, têm reflexo na composição química e nutricional do leite fornecido aos lactentes, o que pode levar a equívocos quanto ao aporte nutricional, calórico e de componentes fundamentais para o desenvolvimento fisiológico dos lactentes, especialmente dos recém-nascidos pré-termo que são os principais receptores do leite doado aos bancos de leite.

Tais variações podem ter sido causadas por vários fatores, como a falta de homogeneização do leite nas fases de processamento, hidrólise térmica de triglicerídios, coalescência dos glóbulos de gordura, adesão de moléculas de gordura nas paredes internas dos recipientes utilizados, formação de cristais de gelo durante o congelamento.

Assim, conclui-se que a absorção de lipídios pelos recém-nascidos pré-termo pode ser menor do que a necessária para seu perfeito desenvolvimento podendo resultar em menores ganho de peso e crescimento.

Deve-se lembrar que, além dos ácidos graxos, há outros nutrientes lipossolúveis que devem ser absorvidos pelo leite humano, como as vitaminas e elementos traços que podem ser destruídos durante o processo térmico e as etapas de congelamento e descongelamento.

Os dados espectroscópicos de IV e RMN ^{1}N demonstram que os resultados obtidos correspondem aos ésteres dos ácidos graxos analisados, evidenciando suas frequências vibracionais características, funções orgânicas e estruturas únicas, comprovando suas presenças no de leite humano.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É prática corrente nos bancos de leite humano (BLH) a pasteurização, pelo processo lento, do leite humano doado e seu posterior armazenamento a -18°C , por até seis meses, com a finalidade de manter e dispor desse produto nos hospitais materno-infantis.

Considerando a importância social incontestável dos bancos de leite humano e em função dos resultados encontrados nesta pesquisa, fazem-se as seguintes recomendações para, assim, minimizar os efeitos da pasteurização e do congelamento sobre a fração lipídica do leite humano:

- (1) reduzir o lapso de tempo entre a coleta e a pasteurização para não favorecer a hidrólise de lipídios;
- (2) optar pela pasteurização rápida ($73^{\circ}\text{C}/15\text{s}$) para inibir a atividade lipolítica, o aumento da concentração de ácidos graxos livres e reduzir o tempo de exposição do leite ao calor;
- (3) no caso da pasteurização lenta, usar equipamentos com sistema de agitação para evitar a coalescência da gordura e, assim, sua perda parcial;
- (4) durante e após o descongelamento do leite em banho-maria, mantê-lo sob agitação até o momento do uso para evitar a aderência das moléculas

de gordura nas paredes do recipiente e sua distribuição de modo não homogêneo aos recém-nascidos;

- (5) há ainda que se considerar que, embora as mães sejam instruídas sobre a coleta caseira do leite, as técnicas de amostragem constituem fator que implica na variação do conteúdo lipídico. Diante disso, constata-se a necessidade de orientação e supervisão contínuas às doadoras para se garantir a homogeneidade do leite antes do beneficiamento (pasteurização e congelamento), uma vez que o teor de gordura varia segundo uma série de fatores e, principalmente, aumenta entre o início e o final da ordenha;
- (6) utilizar recipientes menores para a coleta do leite humano a fim de evitar seu congelamento prolongado, pelas doadoras, e possíveis reações hidrolíticas.

10. REFERÊNCIAS

1. Emmett PM, Rogers IS. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early Human Development*. 1997; 49(Suppl 1):S7-S28.
2. Sena MCF, Silva EF, Pereira MG. Prevalência do aleitamento materno no Distrito Federal, Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 2002; 18(3):613-621.
3. Newman J. How breast milk protects newborns. *Scientific American*. 1995; 273:76-79. Abstract.
4. Rea MFA amamentação e o uso do leite humano: o que recomenda a Academia Americana de Pediatria. *Jornal de Pediatria*. 1998; 74(3):171-173.
5. Prime CC, Caetano LC. A decisão de amamentar da nutriz: percepção de sua mãe. *Jornal de Pediatria*. 1999; 75(6):449-455.
6. Borba LM, Castro LCV, Franceschini SCC, Ferreira CLLF. Composição do leite humano e microbiota predominantemente bífida do lactente em aleitamento materno exclusivo. *Nutrire*. 2003; 25:135-151.
7. Vieira GO, Silva LR, Vieira TO. Alimentação infantil e morbidade por diarreia. *Jornal de Pediatria*. 2003; 79(5):449-454.
8. Rea MF. Reflexões sobre a amamentação no Brasil: de como passamos a 10 meses de duração. *Cad. Saúde Pública*. 2003; 19(Sup.1):S37-S45.
9. German JB, Dillard CJ. Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. *Crit Rev Food Sci. Nutr*. 2006; 46(1):57-92.

10. Jeffery BS, Soma-Pillay YP, Makin J, Moolamn G. The effect of Pretoria pasteurization on bacterial contamination of hand-expressed human breastmilk. *J. Trop Ped.* 2003; 49(4):240-244.
11. Tinoco SMB, Sichieri R, Moura AS, Santos FS, Carmo MGT. Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos trans do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. *Cad Saúde Pública.* 2007; 23(3):525-534.
12. Silva RC, Escobedo JP, Gioielli LA, Quintal VS, Ildi SM, Albuquerque EM. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. *Quim. Nova.* 2007; 30(7):1535-1538.
13. Organização Pan-Americana De Saúde/Organização Mundial de Saúde. Amamentação, 2003. Acessado em: 2009 mai 15. Disponível em: www.opas.org.br/sistema/fotos/amamentar.pdf.
14. Monteiro R. Norma brasileira de comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância: histórico, limitações e perspectivas. *Rev Panam Salud Publica.* 2006; 19(5):354-362.
15. BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 322, de 26 de maio de 1998. Acessado em: 2008 set 4.
16. Garton GA. The composition and biosynthesis of milk lipids. *J Lipid Research.* 1963; 4(3):237-254.
17. Belda MCR, Pouchet-Campos MA. Ácidos graxos essenciais: uma visão atualizada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 1991; 11(1):5-35.

18. Jensen RG, Bitman J, Carlson SE, Couch SC, Hamosh M, Newburg DS. Milk lipids. A. Human milk lipids. *In: Handbook of milk composition*. San Diego: Academic Press; 1995.
19. Fennema OR. ed. *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia; 1993.
20. Higdon J. Omega-3 fatty acids. Linus Pauling Institute, Oregon State University. 2005. Acessado em: 2005 set 9. Disponível em: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/othernuts/omega3fa/index.html>.
21. Jensen RG. Lipids in human milk. *Lipids*. 1999; 34(12):1243-1271.
22. Higdon J. Essential Fatty Acids. Linus Pauling Institute, Oregon State University. 2003. Acessado em: 2003 ago 21. Disponível em: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/othernuts/omega3fa/index.html>.
23. Koletzko B, Rodriguez-Palmero M, Demmelmair H, Fidler N, Jensen R, Sauerwald T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development*. 2001; 65(Suppl 2):S3-S18.
24. Lira BF. Qualidade da fração lipídica do leite humano ordenhado e processado [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2002.
25. Sinclair R. Good, bad or essential fats: what is the story with Omega-3? *Nutrition & Food Science*. 2000; 30(4):178-182.
26. McManaman JL, Neville MC. Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 55(5):615-697.
27. von Schacky C. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004; 7(2):131-136.

28. Burr GO, Burr MM. New deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem.* 1929; 82(2):346-366.
29. Burr GO, Burr MM. On the nature and role of fatty acids essential in nutrition. *J. Biol Chem.* 1930; 86(2):587-621.
30. Christie WW. *Gas chromatography and lipids: a practical guide.* Great Britain: Oily; 1989.
31. Christie WW. Fatty acids: methylene-interrupted double bonds - structures, occurrence and biochemistry. 2010. In: *The Lipid Library.* Acessado em: 2010 dez 7. Disponível em: http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/fa_poly/file.pdf/
32. Stanner S. n-3 fatty acids and health. Conference Report. British Nutrition Foundation. *Nutrition Bulletin.* 2000; 25(1):81-84.
33. Jensen CL, Maude M, Anderson RE, Heird WC. Effect of docosahexaenoic acid supplementation of lactating women on the fatty acid composition of breast milk lipids and maternal and infant plasma phospholipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 71(1):292S-299S.
34. Uauy R. Are fatty acids required for normal eye and brain development in the human? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1990; 11(3):296-302.
35. Sarkar S. Therapeutic aspects of breast milk. *Nutrition & Food Science.* 2004; 34(3):108-112.
36. Gibson RA. The role of long-chain polyunsaturated fatty acids in infancy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004; 39(Suppl. 1):S 551-552.

37. Frazier WC. Microbiologia de los alimentos. 2^a ed. Zaragoza: Acribia, 1972.
38. Chaves JBP. Noções de Microbiologia e Conservação de Alimentos. Viçosa: UFV; 1980.
39. Borgo LA, Araújo WMC. Mecanismos dos processos de oxidação lipídica. Higiene Alimentar. 2005; 19(130):50-58.
40. Leray C. Introduction to lipid peroxidation. Acessado em: 2004 set 18. Disponível em <http://www.cyberlipid.org/perox/oxid0002.htm#1>
41. Stephens HN. Studies in auto-oxidation. I. Cyclohexene peroxide. (Preliminary communication). J Am Chem Soc. 1928; 50(2):568-571.
42. Leray C. Chronological history of lipid science. Acessado em: 2008 jul 23. Disponível em <http://www.cyberlipid.org/history/history1.htm>.
43. Wong DWS. Química de los alimentos: Mecanismos y teoría. Zaragoza: Acribia; 1995.
44. Araújo JMA. Química de alimentos – teoria e prática. 3^a ed. Viçosa: UFV; 2004.
45. Zambiani C. Oxidation reactions of vegetable oils and fats. Bol SBCTA. 1999, 33(1):1-7.
46. Innis SM. Essential fatty acids in infant nutrition: lessons and limitations from animal studies in relation to studies on infant fatty acid requirements. Am J Clin Nutr. 2000; 71(1):238S-244S.

47. Sauerwald TU, Demmelmair H, Koletzko, B. Polyunsaturated Fatty Acid Supply with Human Milk. *Lipids*. 2001; 36(9):991-996.
48. McCowen KC, Bistran BR. Essential fatty acids and their derivatives. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005; 21(2):207-215.
49. Burdge G, Jones AE, Wootton SA. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of α -linolenic acid metabolism in young men. *Br J Nutr*. 2002; 88(4):355-363.
50. Burdge G. α -Linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004; 7(2):137-144.
51. Sprecher H. An update on the pathways of polyunsaturated fatty acid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Care*. 1999; 2(2):135-138.
52. Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, Beilin LJ. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76(5):1007-1015.
53. Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Barden A, Watts GF, Beilin LJ. Effects of purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on platelet, fibrinolytic and vascular function in hypertensive type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2003; 166(1):85-93.
54. Uauy R, Hoffman DR, Peirano P, Birch EE. Essential Fatty Acids in Visual and Brain Development. *Lipids*. 2001; 36(9):885-895.
55. Bistran BR. Clinical aspects of essential fatty acid metabolites: Jonathan Rhoads Lecture. *J Parenter Enteral Nutr*. 2003; 27(3):168-175.

56. Minda H, Kovács, A, Funke S, Szász M, Burus I, Molnár S, Marosvölgyi T, Decsi T. Changes of fatty acid composition of human milk during the first month of lactation: a day-to-day approach in the first week. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 2004; 48(3):202-209.
57. Hall B. Uniformity of human milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 1979; 32(2):304-312.
58. Bitman J, Wood DL, Hamosh M, Hamosh P, Mehta NR. Comparison of the lipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants. *Am J Clin Nutr.* 1983; 38(2):300-312.
59. Read WWC, Lutz PG, Tashjian A. Human Milk Lipids. II. The Influence of Dietary Carbohydrates and Fat on the Fatty Acids of Mature Milk. A Study in Four Ethnic Groups. *Am J Clin Nutr.* 1965; 17(3):180-183.
60. Innis S. M. Essential fatty acids transfer and fetal development. *Placenta*. 2005; 26(Supl. 1):S70-S75.
61. Demmelmair H, Baumheuer M, Koletzko B, Dokoupil K, Kratl, G. Metabolism of U¹³C-labeled linoleic acid in lactating women. *J Lip Research*. 1998; 39(7):1389-1396.
62. Jensen RG, Ferris AM, Lammi-Keefe CJ, Henderson A. Lipids of bovine and human milks: a comparison. *J. Dairy Sci.* 1999; 73(2):223-240.
63. Jensen RG, Ferris AM, Lammi-Keefe CJ. The composition of milk fat. *J. Dairy Sci.* 1991; 74(9):3228-3243.
64. Grummer RR. Effect of feed on the composition of milk fat. *J Dairy Sci.* 1991; 74(9):3244-3257.

65. Innis SM, Dyeer RR, Nelson CM. Evidence That Palmitic Acid Is Absorbed as sn-2 Monoacylglycerol from Human Milk by Breast-Fed Infants. *Lipids*. 1994; 29(8):541-545.
66. Small DM. The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* 1991; 11:413-434.
67. Carnielli VP, Luijendijk IHT, Van Goudoever JB, Sulkers EJ, Boerlage AA, Degenhart H, Sauer PJJ. Structural Position and Amount of Palmitic Acid in Infant Formulas: Effects on Fat, Fatty Acid, and Mineral Balance. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 1996; 23(5):553-560.
68. Pafumi Y, Lairon D, de la Porte PL, Juhel C, Storch J, Hamosh M, Armand M. Mechanisms of Inhibition of Triacylglycerol Hydrolysis by Human Gastric Lipase. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(2):28070-28079.
69. Carrière F, Renou C, Lopez V, De Caro J, Ferrato F, Lengsfeld H, De Caro A, Laugier R, Verger R. The Specific Activities of Human Digestive Lipases Measured From the In Vivo and In Vitro Lipolysis of Test Meals. *Gastroenterology*. 2000; 119(4):949-960.
70. Barber MC, Clegg RA, Travers MT, Vernon RG. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1347(2,3):101-126.
71. Basmak H, Yildirim N, Erdinc O, Yurdakul S, Ozdemir G. Effect of levodopa therapy on visual evoked potentials and visual acuity in amblyopia. *Ophthalmologica*. 1999; 213(2):, 110-113.
72. Fleith M, Clandinin MT. Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005; 45(3):205-229.

73. Zimmer L, Vancassel S, Contagrel S, Breton P, Delmanche S, Guilloteau D, Durand G, Shalon S. The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75(4):662-777.
74. Innis S. M. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Pediatr.* 2003; 143(4):S1-S8.
75. Jensen RG. The lipids in human milk. *Prog. Lipid Res.* 1996; 35(1):53-92
76. Sarkar S. Nutritional aspects of breast milk. *Nutrition & Food Science.* 2004; 34(4):151-155.
77. Horwood LJ; Ferguson DM. Breastfeeding and later cognitive development and academic outcomes. *Pediatrics.* 1998; 101(1):9-15.
78. Temboury MC, Otero A, Polanco I, Arribas E. Influence of breastfeeding on the infant's intellectual development. *J Pediatr Gastroenterol. Nutr.* 1994; 18(1):32-36.
79. Lanting CI, Huisman M, Boersma ER, Touwen BCL, Fidler V. Neurological differences between 9 year-old children fed breast-milk or formula as babies. *Lancet.* 1994; 344(8933):1319-1922.
80. Lucas, A, Morley R, Cole TJ, Lister G, Lesson-Payne C. Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet.* 1992; 339(8788):261-264.
81. Innis SM, Gilley J, Werker J. Are human milk long-chain polyunsaturated fatty acids related to visual and neural development in breast-fed term infants? *J. Pediatr.* 2001; 139(4):532-538.

82. Jorgensen MH, Hernell O, Hughes EL, Michaelsen KF. Is there a relation between docosahexaenoic acid concentration in mother's milk and visual development in term infants? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001; 32(3):293-296.
83. Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Lucas A. Breastmilk feeding and lipoprotein profile in adolescents Born preterm: follow-up a prospective randomised study. *Lancet.* 2004; 363(9421):1571-1578.
84. Mozaffarian MD, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Trans Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2006; 340(15):1601-1613.
85. IFST (Institut of Food Science & Technology). Trans fatty acids. 2007. Acessado em: 2008 mai 12. Disponível em: www.ifst.org.
86. Booyens J, Merwe van der CF. Margarines and coronary artery disease. *Medical Hypotheses.* 1992; 37:241-244.
87. Judd J.T, Clevidence BA, Muesing RA, Wittes J. Sunkin ME, Podczasy JJ. Dietary *trans* fatty acids: effects on plasma lipids and lipoprotein of healthy men and women. *Am J Clin Nutr.* 1995; 59(4):861-868.
88. Mensink R, Hornstra G. The proportion of *trans* monounsaturated fatty acids in serum triacylglycerols or platelet phospholipids as an objective indicator of their short-term intake in healthy men. *Brit J Nutr.* 1995; 73(4):605-612.
89. Garland M, Sacks FM, Colditz GA, Rimm EB, Sampson LA, Willett WC, Hunter DJ. The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67(1):25-30.

90. Jensen RG. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* 2002; 85(2):295–350.
91. Adlof RO, Duval S, Emken EA. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in humans. *Lipids.* 2000; 35(2):131-135.
92. Turpeinem AM, Mutanem M, Aro A, Salminen I, Basu S, Pamquist DL, Griinari JM. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(3):504-510.
93. Mann GV. Metabolic consequences of dietary trans fatty acids. *Lancet.* 1994; 343(8908):1268-1273.
94. Martin CA, Matshushita M, Souza N. E. Ácidos graxos *trans*: implicações nutricionais e fontes na dieta. *Rev Nutr Campinas.* 2004; 17(3):361-368.
95. IDF (International Dairy Federation). Trans fatty acids: scientific progress and labeling. Bulletin 393/2005, 2005. Acessado em: 2008 mai 3. Disponível em:
<http://www.idfdairynutrition.org/Files/media/Publications/393-2005.pdf>
96. Clarke R, Lewington S. Trans fatty acids and coronary heart disease. *British Medical Journal.* 2006; 333(7561):214.
97. Chiara V.L, Silva R, Jorge R, Brasil AP. Ácidos graxos *trans*: doenças cardiovasculares e saúde materno-infantil. *Rev Nutr Campinas.* 2002; 15(3):341-349.
98. Khosla P, Hayes KC. Dietary trans-monounsaturated fatty acids negatively impact plasma lipids in humans: critical review of the evidence. *J Am Col Nutrition.* 1996; 15(4):325-339.

99. Feldman EB, Kris-Etherton PM, Kritchevsky D, Lichtenstein AL. Position paper on *trans* fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 1996; 63:663-670.
100. Ascherio A, Katan MB, Stampfer MJ. Trans fatty acids and coronary heart disease. *N Engl M J.* 1999; 340(25):1994-1998.
101. Scherr C, Ribeiro P. O que o cardiologista precisa saber sobre gorduras trans. *Arq Bras Cardiol.* 2008; 90(1):e4-e7.
102. Jardini FA, Mancini FJ. Composição centesimal e perfil dos ácidos graxos da romã (*Punica granatum, L.*) cultivada no Brasil. *Revista Higiene Alimentar.* 2007; 21(148):81-85.
103. Anderson JT, Grande F, Keys A. Hydrogenated fats in the diet and lipids in the serum of man. *J Nutr.* 1961; 75(4):388-394.
104. Subbaiah PV, Subramanian VS, Liu M. Trans unsaturated fatty acids inhibit lecithin: cholesterol acyltransferase and alter its positional specificity. *J. Lipid Res.* 1998; 39(7):1438-1447.
105. van Tol A, Zock PL, van Gent T, Scheek LM, Katan MB. Dietary trans fatty acids increase serum cholesterylester transfer protein activity in man. *Atherosclerosis.* 1995; 115(1):129-134.
106. Nestel P, Noakes M, Belling B, McArthur R, Clifton P, Janus E, Abbey M. Plasma lipoprotein lipid and Lp[a] changes with substitution of elaidic acid for oleic acid in the diet. *J Lipid Res.* 1992; 33(7):1029-1036.
107. Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77(5):1146-1155.

108. Willett WC, Meir JS, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Rosner BA, Sampson LA, Hennekens CH. Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *Lancet*. 1993; 341(8845):581-585.
109. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105(9):1135-1143.
110. Albert CM, MA J, RIFAI N, STAMPFER MJ, RIDKER PM. Prospective Study of C-Reactive Protein, Homocysteine, and Plasma Lipid Levels as Predictors of Sudden Cardiac Death. *Circulation*. 2002; 105(22):2595-2599.
111. Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(3):813-823.
112. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*. 1987; 12(8):1881-1887. Abstract.
113. Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW. Mammary Cancer Prevention by Conjugated Dienoic Derivative of Linoleic Acid. *Cancer Res*. 1991; 51(22):6118-6124.
114. Ip C, Singh M, Thompson HJ, Scimeca JA. Conjugated Linoleic Acid Suppresses Mammary Carcinogenesis and Proliferative Activity of the Mammary Gland in the Rat. *Cancer Res*. 1994; 54(5):1212-1215.
115. Ip C, Briggs SP, Haegele AD, Thompson HJ, Storkson NJ, Scimeca JA. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis*. 1996; 17(5):1045-1050.

116. Pariza MW, Park Y, Cook ME. Conjugated linoleic acid and the control of cancer and obesity conjugated linoleic acid and the control of cancer and obesity Conjugated linoleic acid and the control of cancer and obesity. *Toxicol. Sci.* 1999; 52(Suppl 1):107-110, 1999.
117. Kritchevsky D. Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. *Brit J Nutr.* 2000; 83(5):459-465.
118. MacDonald HB. Conjugated Linoleic Acid and Disease Prevention: A Review of Current Knowledge. *J Am Coll Nutr.* 2000; 19(2):111S-118S.
119. Pariza MW, Park Y, Cook ME. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 2000; 223(1):8-13, 2000.
120. O'Shea M, Devery R, Lawless F, Murphy J, Stanton C. Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of human mammary MCF-7 cancer cells. *Anticancer Res.* 2000; 20(5B):3591-3601. Abstract.
121. Devery R, Miller A, Stanton C. Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. *Biochem Soc Trans.* 2001; 29(2):341-344. Abstract.
122. Nicolasi RJ, Rogers EJ, Kritchevsky D, Scimeca JA, Huth PJ. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery.* 1997; 22(5):266-277. Abstract.
123. Chin SF, Storkson JM, Albright KJ, Cook ME, Pariza MW. Conjugated Linoleic Acid Is a Growth Factor for Rats as Shown by Enhanced Weight Gain and Improved Feed Efficiency. *J Nutr.* 1994; 124(12): 2344-2349.

124. Cook ME, Miller CC, Park Y, Pariza MW. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult. Sci.* 1993; 72(7):1301-1305. Abstract.
125. Miller CC, Park Y, Pariza MW, Cook ME. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 198(3):1107-1112.
126. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. RDC 360 de 23 de dezembro de 2003. Acesso em: 2008 mai 15. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9059&word=>
127. Hudgins LC, Hirsch J, Emken EA. Correlation of isomeric fatty acids in human adipose tissue with risk factors for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53(2):474-482.
128. Baylin A, Kabagambe EK, Ascherio A, Spiegelman D, Campos H. High 18:2 trans-fatty acids in adipose tissue are associated with increased risk of nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rican adults. *J Nutr.* 2003; 133(4):1186-1191.
129. Larqué E, Zamora S, Gil, A. Dietary trans fatty acids in early life: a review. *Early Hum Dev.* 2001; 65(Suppl 2):S31-S41.
130. Orozco AL. Ácidos grasos trans, cops y lops: evidencia actual de su influencia sobre la salud infantil. *Acta Pediatr Esp.* 2005; 63:22-26.
131. Mojska H. Influence of trans fatty acids on infant and fetus development. *Acta Microbiol Pol.* 2003; 52(67):67-74. Abstract

132. Aitchison JM, Dunkley WL, Canolty NL, Smith. LM. Influence of diet on *trans* fatty acids in human milk. *Am J Clin Nutr.* 1997; 30(12):2006-2015.
133. Dionisi F, Golay PA, Fay LB. Influence of milk fat presence on the determination of *trans* fatty acids in fats used for infant formulae. *Analytica Chimica Acta.* 2002; 465(1-2):395–407.
134. Insull W, Hirsch J, James T, Ahrens EH. The fatty acids of human milk. II. Alterations produced by manipulation of caloric balance and exchange of dietary fats. *J. Clin. Invest.* 1959; 38(2):443-450.
135. Kurata N, Privett OS. Effects of Dietary *trans* Acids on the Biosynthesis of Arachidonic Acid in Rat Liver Microsomes. *Lipids.* 1980; 15(12):1029-1036.
136. Field CJ, Angel A, Clandinin MT. Relationship of diet to the fatty acid composition of human adipose tissue structural and stored lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 1985; 42(6):1206-1220.
137. Martins FJ. Evolução do Aleitamento Materno no Brasil. Acessado em: 2003 dez 18. Disponível em www.epub.org.br/nutriweb/0302/livromartinsfilho.htm.
138. Javorski M. Os programas nacionais de incentivo ao aleitamento materno: uma análise crítica. *Revista Pediatria Moderna.* 1999; 35(1/2):30-36.
139. Stevens CR, Millar TM, Clinch JG, Kanczler JM, Bodamyali T, Blake DR. Antibacterial properties of xanthine oxidase in human milk. *Lancet.* 2000; 356(9232):829-830.

140. Hancock JT, Salisbury V, Ovejero-Boglione MC, Cherry R, Hoare C, Eisenthal R, Harrison R. Antimicrobial Properties of Milk: Dependence on Presence of Xanthine Oxidase and Nitrite. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(10):3308-3310.
141. BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz. Manual técnico. 2008. Acessado em: 2008 ago 21. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/redeblh>.
142. Matta AM. Banco de leite humano. Sinopse de Pediatria [periódico eletrônico] 2001; 7(3). Acessado em: 2004 set 8. Disponível em: http://www.cibersaude.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_matéria=1648.
143. Salviano S. Leite materno é saúde. *Nutrição em Pauta.* 2004; 67. Acessado em 2005 ago 3. Disponível em <http://www.nutricaoempauta.com.br/novo/index.html>.
144. BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz. Manual técnico. Acessado em: 2004 ago 15. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/redeblh>.
145. Marques RFSV, Lopez FA, Braga JAP. O crescimento de crianças alimentadas com leite materno exclusivo nos primeiros 6 meses de vida. *Jornal de Pediatria.* 2004; 80(2):99-105.
146. Moutinho K, Roazzi, A, Gouveia EL. Amamentação e desmame precoce. *Revista Pediatria Moderna.* 2001; 37(8)394-398.
147. Araújo MFM, Fiaco AD, Wener EH, Schmitz BAS. Incentivo ao aleitamento materno no Brasil: evolução do Projeto Carteiro Amigo da Amamentação de 1996 a 2002. *Revista Brasileira Saúde Materno Infantil.* 2003; 3(2):195-204.

148. Oliveira RL, Silva AN. Aspectos legais do aleitamento materno: cumprimento da lei por hospitais de médio e grande porte de Maceió. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. 2003; 3(1):43-48.
149. Audi CFA, Corrêa MAS, Latorre MRD. Os alimentos complementares e fatores associados ao aleitamento materno e ao aleitamento materno exclusivo em lactentes até 12 meses de vida em Itapira, São Paulo, 1999. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. 2003; 3(1):85-93.
150. Percegoni N, Araújo RMA, Silva MMS, Euclides MP, Tinôco ALA. Conhecimento sobre aleitamento materno de puérperas atendidas em dois hospitais de Viçosa, Minas Gerais. *Revista Nutrição*. 2002; 15(1):29-35.
151. Kitoko PM, Réa MF, Venancio SI, Vasconcelos ACCP, Santos EKA, Monteiro CA. Situação do aleitamento materno em duas capitais brasileiras: uma análise comparada. *Caderno de Saúde Pública*. 2000; 16(4):1111-1119.
152. Ramos KL. Os programas de aleitamento materno e a qualidade do leite ofertado a crianças pretermo pelos Bancos de Leite Humano: uma revisão. [Monografia], Universidade de Brasília, Curso de Especialização em Qualidade em Alimentos, Centro de Excelência em Turismo; 2004.
153. Siqueira R, Durso N, Almada AGP, Moreira MT, Massad GB. Reflexões sobre as causas do desmame precoce observadas em dinâmicas de grupo de incentivo ao aleitamento materno. *Jornal de Pediatria*. 1994; 70(1):16-20.
154. Moura EFA. Duração do período de aleitamento materno de crianças atendidas em ambulatório de pediatria. *Jornal de Pediatria*. 1997; 73(2):106-110.

155. Kamiya E, Ramos MIL. Avaliação microbiológica e calórica do leite humano coletado e distribuído no Banco de Leite Humano do Hospital Universitário/NHU/UFMS. *Higiene Alimentar* 2003; 17(109):64-68.
156. Novak RF, Almeida JAG, Asensi MD, Moraes BA, Rodrigues DP. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. *Caderno de Saúde Pública*. 2001; 17(3):713-717.
157. Pascoa MF. Pasteurização do leite materno: vantagens e desvantagens. *Higiene Alimentar*. 1997; 11(50):14-19.
158. Henderson TR, Fay TN, Hamosh M. Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *Journal of Pediatrics*. 1998; 132(5):876-878.
159. Koenig A, Diniz EMA, Barbosa SFC, Vaz FAC. Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization. *J Hum Lact*. 2005; 21(4):439-443.
160. Van de Perre, P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine*. 2003; 21(24):3374-3376.
161. Almeida JAG, Novak FR, Almeida CHG; SERVA VB. Avaliação parcial da flora microbiana do leite humano ordenhado no IMIP. *Revista do IMIP*. 1989; 3(1):13-16.
162. Bjorkstén B, Burman LG, Château P, Fredrikzon B, Gothefors L, Hernell O. Collecting and banking human milk: to heat or not to heat? *British Medical Journal*. 1980; 281(20):765-769.
163. Hamosh M, Ellis LA, Pollock DR, Henderson TR, Hamosh P. Breastfeeding and the working mother: effect os time and temperature of

- short-term storage of proteolysis, lipolysis, and bacterial growth in milk. *Pediatrics*. 1996; 97(4):492,498. Abstract.
164. Lepri L, Del Bubba M, Maggini R, Donzelli GP, Galvan P. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. *J. Chromatography B*. 1998; 704(1-2):1-10.
165. Borgo LA, Ramos KL, Almeida SG, Seide LO, Oliveira LA, Cardoso L, Araújo WMC. Avaliação do funcionamento e identificação de pontos críticos de controle em Bancos de Leite Humano no Distrito Federal. *Higiene Alimentar*. 2005; 19(129):43-46.
166. Fidler N, Sauerwald TU, Koletzko B, Demmelmair H. Effects of human pasteurization and sterilization on available fat content and fatty acid composition. *Journal of Pediatric*. 1998; 27(3):317-322.
167. Lakatos EM, Marconi M. de A. Fundamentos da metodologia científica. 3 ed. São Paulo: Atlas; 1991.
168. Oliveira CS. Metodologia científica, planejamento e técnica de pesquisa: uma visão holística do conhecimento humano. São Paulo: LTB; 2000.
169. BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz. Normas Técnicas para Bancos de Leite Humano. 2005a. Acessado: 2005 mai 15. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/redeblh>.
170. BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.
171. Alan F, Wolfschoon P. Determinação do teor de gordura em queijo. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. 1980; p03-13, jan-fev.

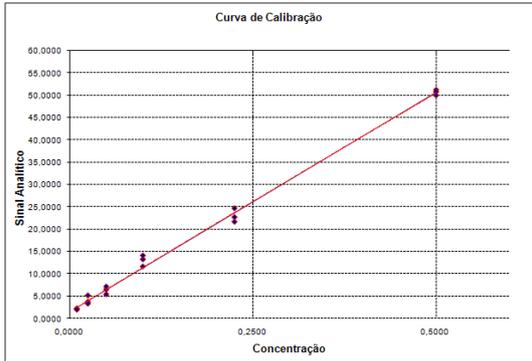
172. Scott RPW. Principles and practice of chromatography. LibraryForScience, Chrom-Ed Book Series. Book 1. 2003. Acessado 2008 jul 23. Disponível em <http://www.library4science.com/>.
173. Degani ALG, Cass QB, Vieira PC. Cromatografia: um breve ensaio. Química Nova na Escola, Cromatografia. 1998; 7:21-25.
174. Visentainer JV, Franco MRB. Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação. São Paulo: Varela; 2006.
175. Eiceman NGA. Instrumentation of gas chromatography. Encyclopedia of Analytical Chemistry. 2000; p. 10.671-10.679.
176. Augusto F. Cromatografia a gás: curso em diapositivos. [Internet]. Acesso em 2010 out 20. Disponível em: <http://chemkeys.com/br/2000/07/18/cromatografia-a-gas-curso-em-diapositivos>.
177. Hsu S. Infrared spectroscopy. Cap. 15. In: Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. New Jersey, Prentice-Hall, 1997. 968p. Acessado em: 2008 mar 30. Disponível em <http://www.filestube.com/9fa9ac6538e1c83403e9/details.html>.
178. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry. 3rd ed. USA: Thomson Learning; 2001.
179. Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. Spectrometric identification of organic compounds. 5th ed. New York: John Wiley & Sons; 1991.
180. Hopkins CY, Bernstein HJ. Applications of Proton Magnetic Resonance Spectra in Fatty Acid Chemistry. Can J Chem. 1959; 37:775-782.

181. Gerothanassis IP, Troganis A, Exarchou V, Barbarossou K. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: basic principles and phenomena, and their applications to chemistry, biology and medicine. *Chemistry Education: Res Pract Eur.* 2002; 3(2):229-252.
182. Levitt MH. *Basics of nuclear magnetic resonance*. 2000. Acessado em 2008 jul 10. Disponível em:
<http://www.mhl.soton.ac.uk/public/publications/books/SpinDynamics/SD1/SDpreview.pdf>
183. Nascimento CJ, Block Jr.C. Ressonância Magnética Nuclear: *Gradus Primus*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 2001; 21:52-61.
184. Silverstein RM, Webster FS, Kiemle DJ. *Spectrometric identification of organic compounds*. 7th ed. New York: John Wiley & Sons; 2005.
185. Settle FA. ed. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. New Jersey: Prentice Hall; 1997.
186. McMurry J. *Química Orgânica*. 4^a ed. v1. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos; 1997.
187. McMurry J. *Química Orgânica*. 4^a ed. v1. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos; 1997.
188. Goldblum RM, Dill CW, Albrecht TB, Alford ES, Garza C, Goldman AS. Rapid high-temperature treatment of human milk. *J. Pediatric*. 1984; 104(3):380-385.
189. Romeu-Nadal M, Castellote AI, López-Sabater MC. Effect of cold storage on vitamins C and E and fatty acids in human milk. *Food Chemistry*. 2008; 106(1):65-70.

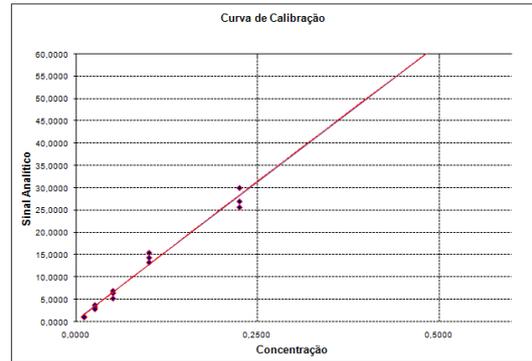
190. Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Romero FJ. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr.* 2008; 97(2):1070–1074.
191. Wardell JM, Hill CM, S'Souza SW. Effect of pasteurization and of freezing and thawing human milk on its triglyceride content. *Acta Paediatr. Scand.* 1981; 70(4):467-471.
192. Fidler N, Sauerwald TU, Demmelmair H, Koletzko B. Fat content and fatty acid composition of fresh, pasteurized, or sterilized human milk. *Adv Exp Med Biology.* 2001; 501:485-95. Abstract. Acesso em: 2009 out 28 Disponível em:
http://www.biomedexperts.com/Abstract.bme/11787720/Fat_content_and_fatty_acid_composition_of_fresh_pasteurized_or_sterilized_human_milk
193. Williamson S, Finucane E, Ellis H, Gamsu HR. Effect of heat treatment of human milk on absorption of nitrogen, fat, sodium, calcium, and phosphorus by preterm infants. *Arch Dis Childhood.* 1978; 53(7):555-563.
194. Anderson Y, Savman K, Blackberg L, Hernell O. Pasteurization of mother's own milk reduces fat absorption and growth in preterm infants. *Acta Paediatr.* 2007; 96(10):1445-1449.
195. Heiman H, Schanler RJ. Benefits of maternal and donor human milk for premature infants. *Early Human Development.* 2006; 82(12):781-787.
196. Weber AL, Loui A, Jochum F, Bücher C, Obladen M. Breast milk from mothers of very low birthweight infants: variability in fat and protein content. *Acta Paediatr.* 2001; 90(7):772-775.

197. Nena PN, Milad MA. Variaciones en la composición nutricional de la leche materna. Algunos aspectos de importancia clínica. Ver Chil Pediatr. 1998; 69(3):116-121.
198. Wang L, Shjmizu Y, Kaneko S, Hanaka S, Abe T, Shimasaki H, Hisaki H, Nakajima H. Comparison of the fatty acid composition of total lipids and phospholipids in breast milk from Japanese women. Ped Int. 2000; 42(1):14–20.
199. Lönnerdal BO. Effects of Maternal Dietary Intake on Human Milk Composition. J. Nutr. 1986; 116(4):499-513.

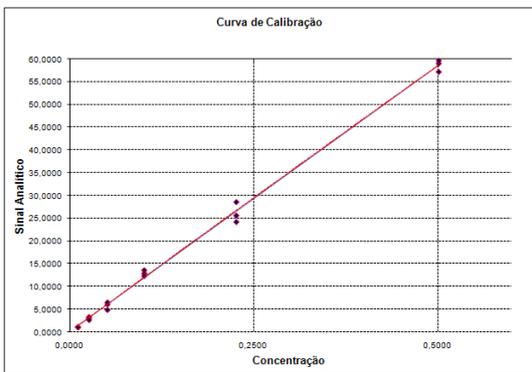
APÊNDICE A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS ANALISADOS



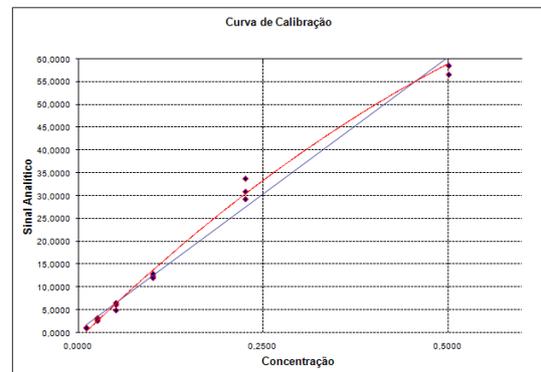
Ácido cáprico: $Y=98,1438x+1,6274$; $r=0,9979$



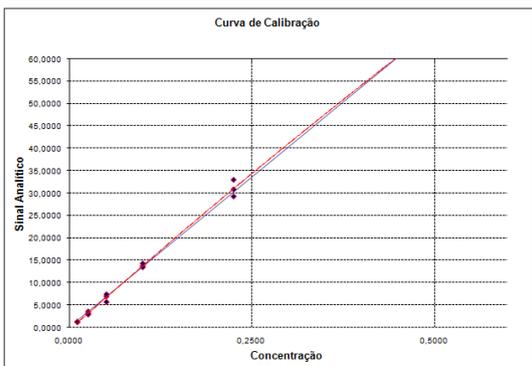
Ácido láurico: $Y=123,8136x+0,4386$; $r=0,9984$



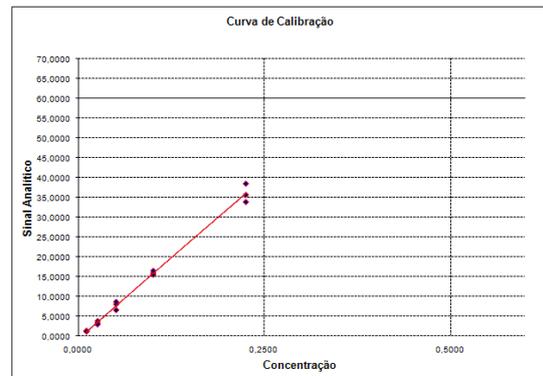
Ácido mirístico: $Y=116,7559x+0,2698$; $r=0,9986$



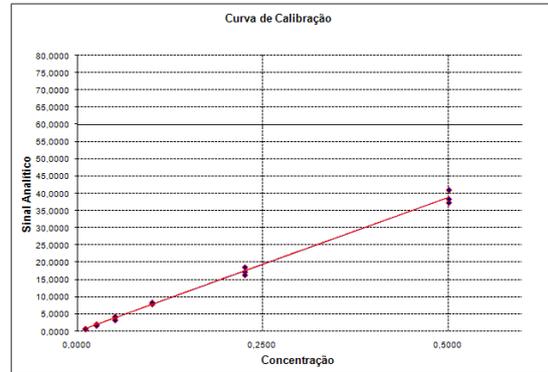
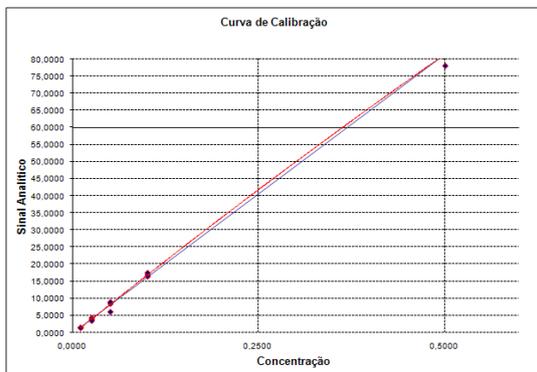
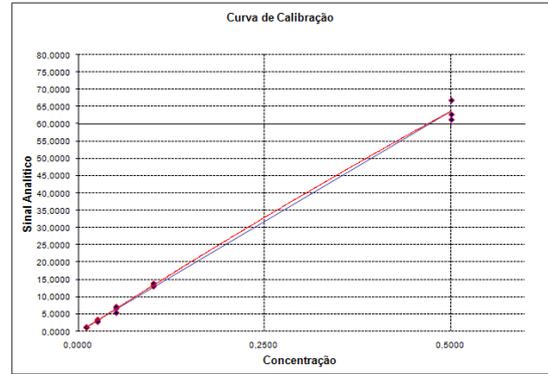
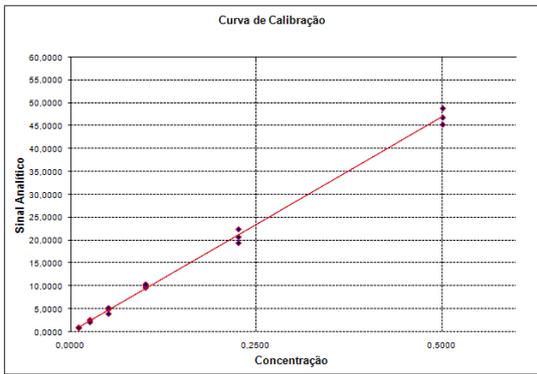
Ácido palmítico: $Y=119,4827x+0,6378$; $r=0,9948$



Ácido esteárico: $Y=134,0429x+0,1331$; $r=0,9982$

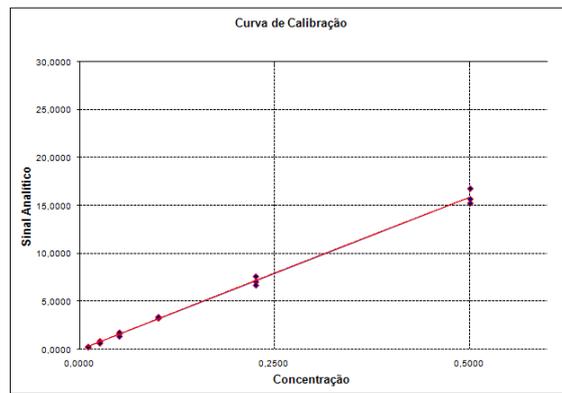


Ácido araquídico: $Y=162,4948x-0,4889$; $r=0,9970$



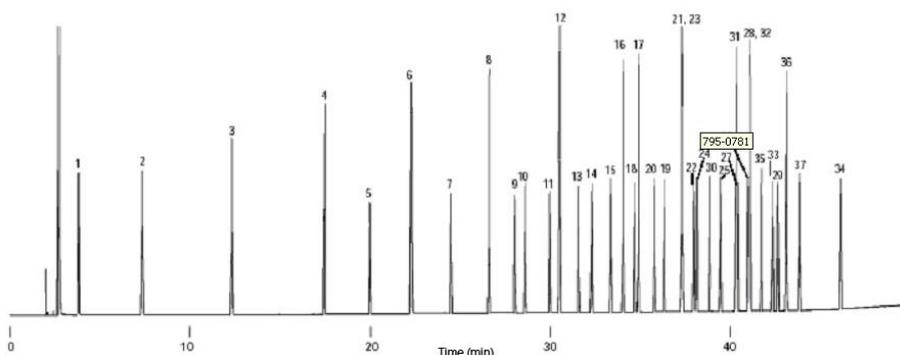
Ácido linoleico ZZ: $Y=162,7283x+0,0127$; $r=0,9987$

Ácido linoleico ZE: $Y=77,5848x+0,0076$; $r=0,9983$

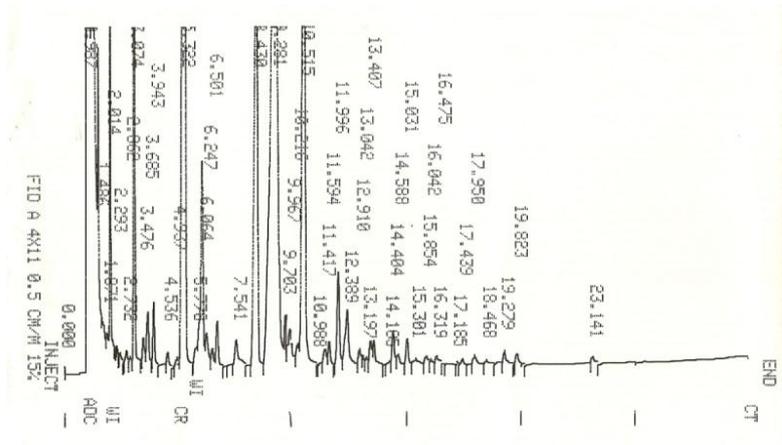


Ácido linolênico: $Y=31,7779x - 0,0185$; $r=0,9983$

APÊNDICE B – PADRÃO CROMATOGRÁFICO

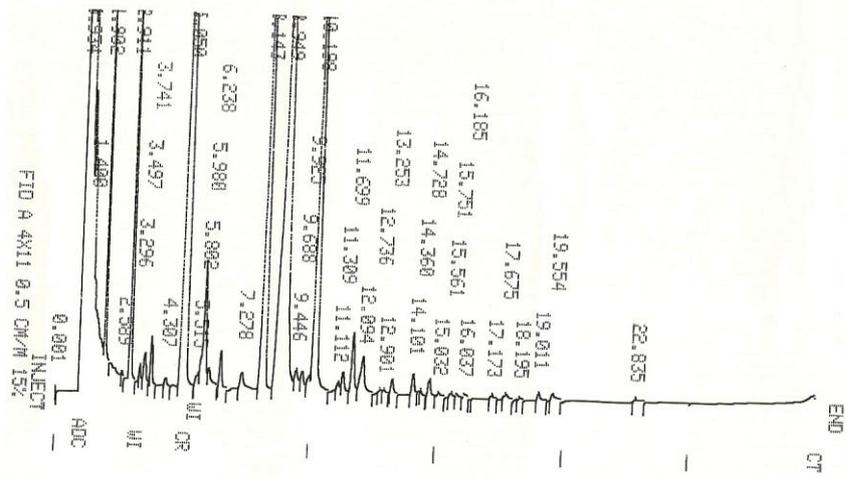


1. Butyric Acid Methyl Ester (C4:0) at 4 wt %
2. Caproic Acid Methyl Ester (C6:0) at 4 wt %
3. Caprylic Acid Methyl Ester (C8:0) at 4 wt %
4. Capric Acid Methyl Ester (C10:0) at 4 wt %
5. Undecanoic Acid Methyl Ester (C11:0) at 2 wt %
6. Lauric Acid Methyl Ester (C12:0) at 4 wt %
7. Tridecanoic Acid Methyl Ester (C13:0) at 2 wt %
8. Myristic Acid Methyl Ester (C14:0) at 4 wt %
9. Myristoleic Acid Methyl Ester (C14:1) at 2 wt %
10. Pentadecanoic Acid Methyl Ester (C15:0) at 2 wt %
11. cis-10-Pentadecenoic Acid Methyl Ester (C15:1) at 2 wt %
12. Palmitic Acid Methyl Ester (C16:0) at 6 wt %
13. Palmitoleic Acid Methyl Ester (C16:1) at 2 wt %
14. Heptadecanoic Acid Methyl Ester (C17:0) at 2 wt %
15. cis-10-Heptadecenoic Acid Methyl Ester (C17:1) at 2 wt %
16. Stearic Acid Methyl Ester (C18:0) at 4 wt %
17. Oleic Acid Methyl Ester (C18:1n9c) at 4 wt %
18. Elaidic Acid Methyl Ester (C18:1n9t) at 2 wt %
19. Linoleic Acid Methyl Ester (C18:2n6c) at 2 wt %
20. Linolelaidic Acid Methyl Ester (C18:2n6t) at 2 wt %
21. γ -Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3n6) at 2 wt %
22. α -Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3n3) at 2 wt %
23. Arachidic Acid Methyl Ester (C20:0) at 4 wt %
24. cis-11-Eicosenoic Acid Methyl Ester (C20:1n9) at 2 wt %
25. cis-11,14-Eicosadienoic Acid Methyl Ester (C20:2) at 2 wt %
26. cis-8,11,14-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C20:3n6) at 2 wt %
27. cis-11,14,17-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C20:3n3) at 2 wt %
28. Arachidonic Acid Methyl Ester (C20:4n6) at 2 wt %
29. cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic Acid Methyl Ester (C20:5n3) at 2 wt %
30. Heneicosanoic Acid Methyl Ester (C21:0) at 2 wt %
31. Behenic Acid Methyl Ester (C22:0) at 4 wt %
32. Erucic Acid Methyl Ester (C22:1n9) at 2 wt %
33. cis-13,16-Docosadienoic Acid Methyl Ester (C22:2) at 2 wt %
34. cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid Methyl Ester (C22:6n3) at 2 wt %
35. Tricosanoic Acid Methyl Ester (C23:0) at 2 wt %
36. Lignoceric Acid Methyl Ester (C24:0) at 4 wt %
37. Nervonic Acid Methyl Ester (C24:1n9) at 2 wt %

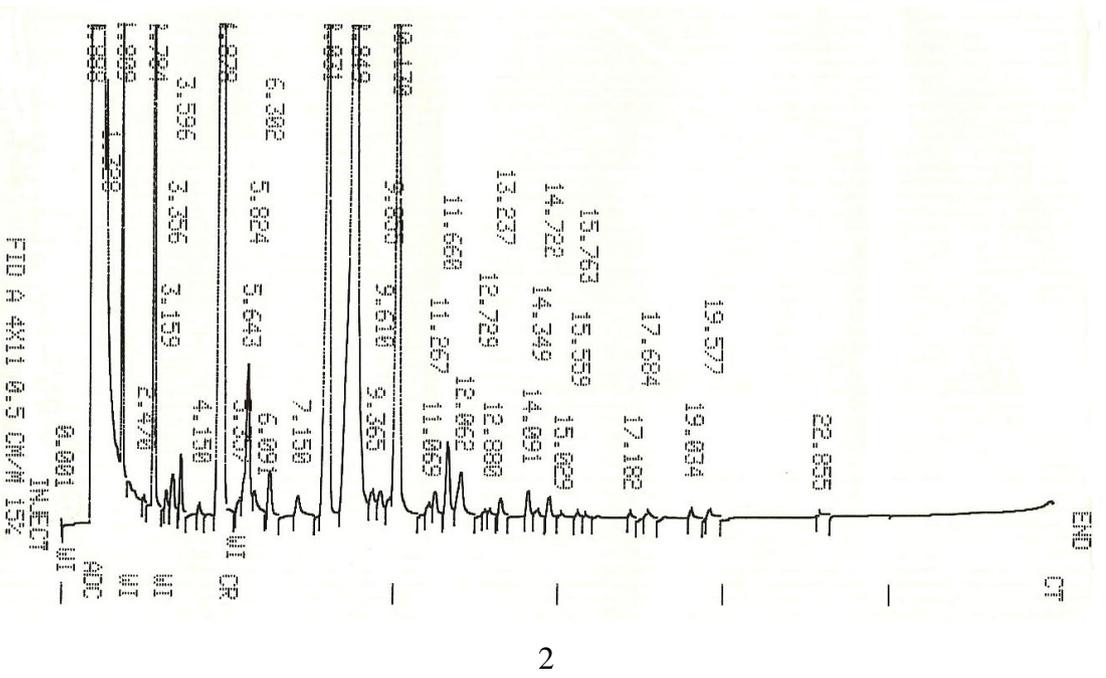


3

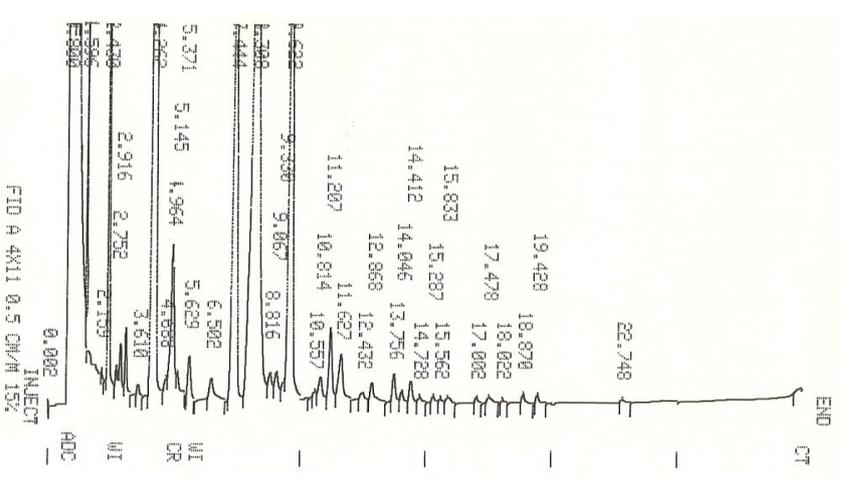
b) Leite pasteurizado – tempo zero



1

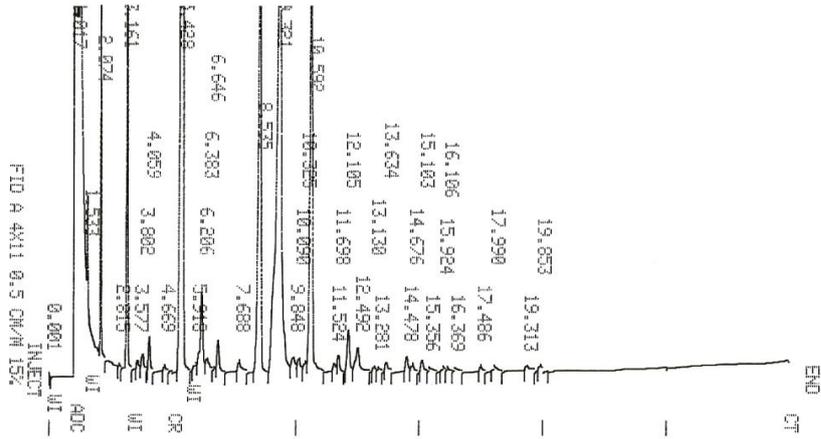


2

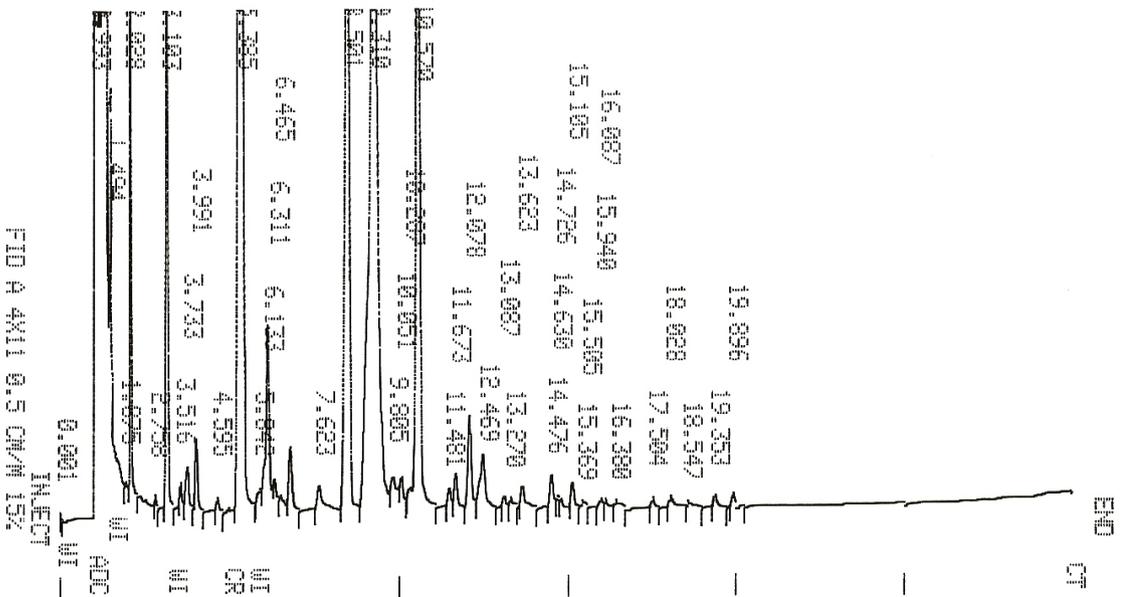


3

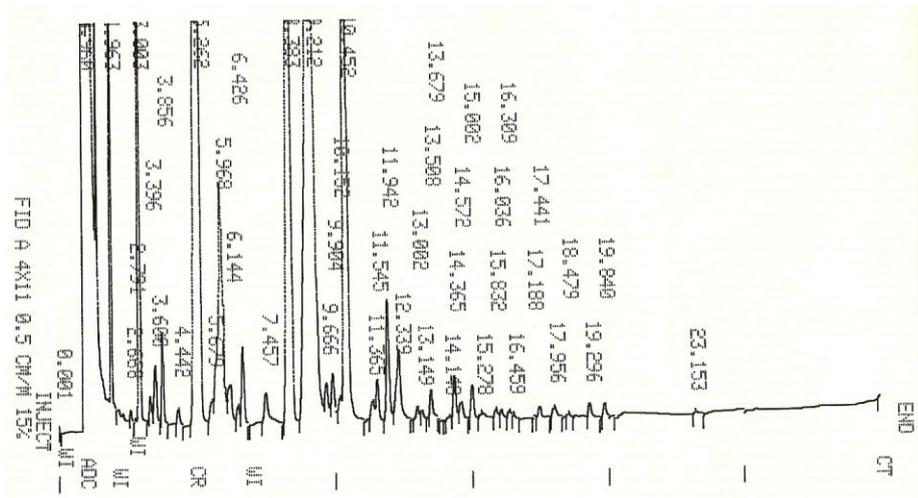
c) Leite pasteurizado – 30 dias



1

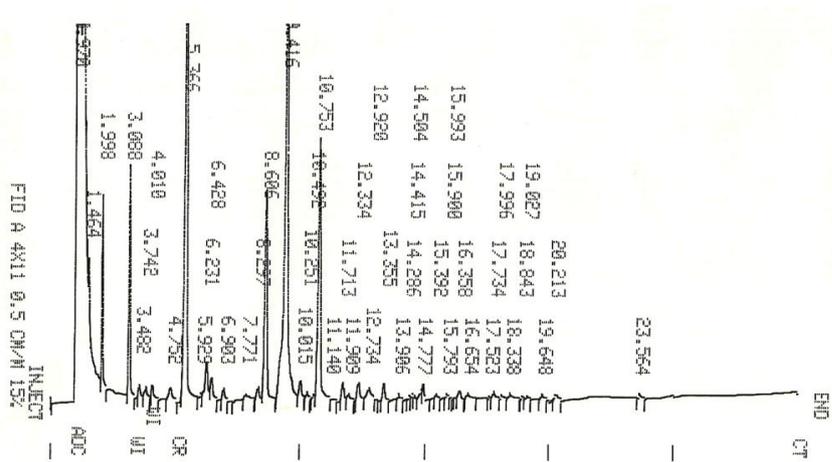


2

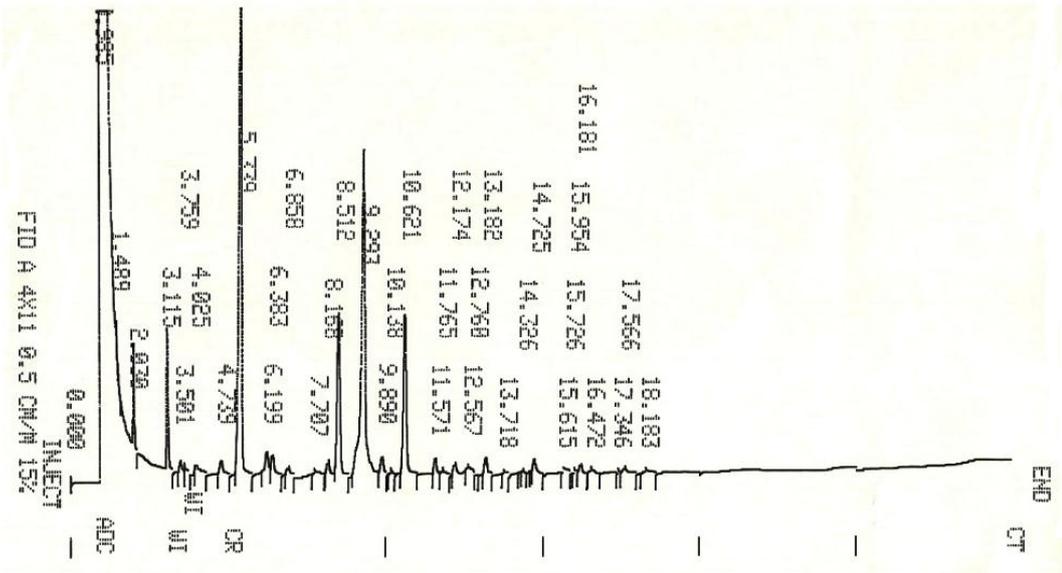


3

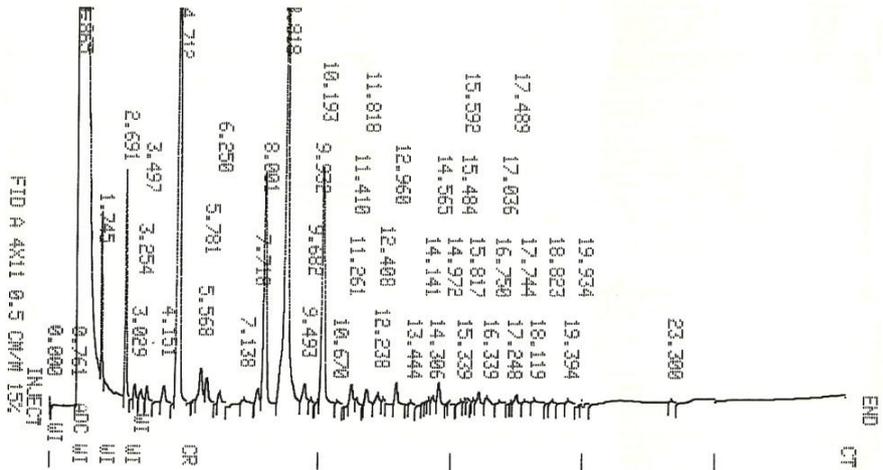
d) Leite pasteurizado – 60 dias



1

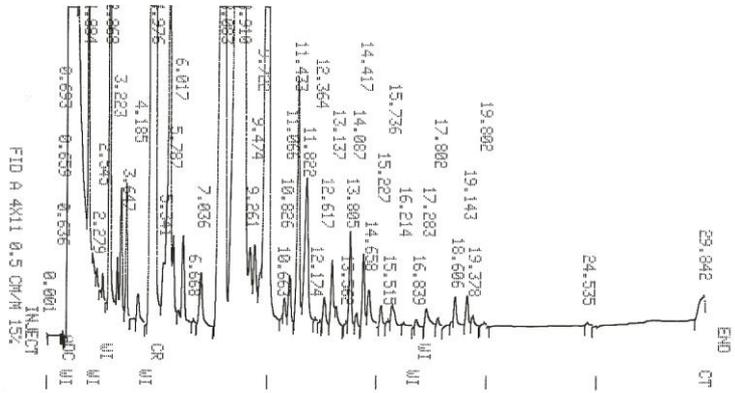


2

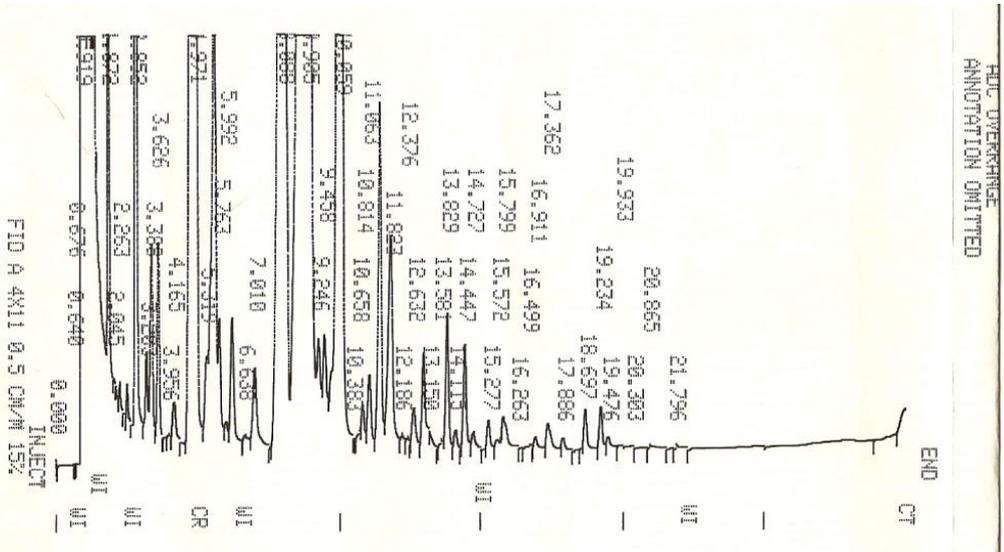


3

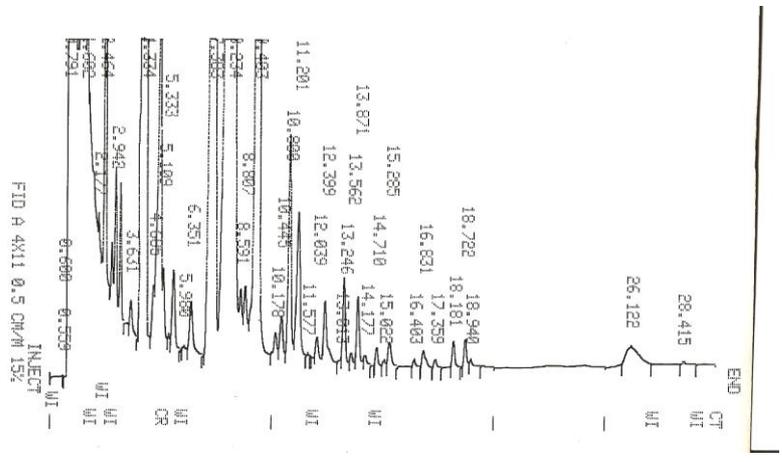
e) Leite pasteurizado – 90 dias



1

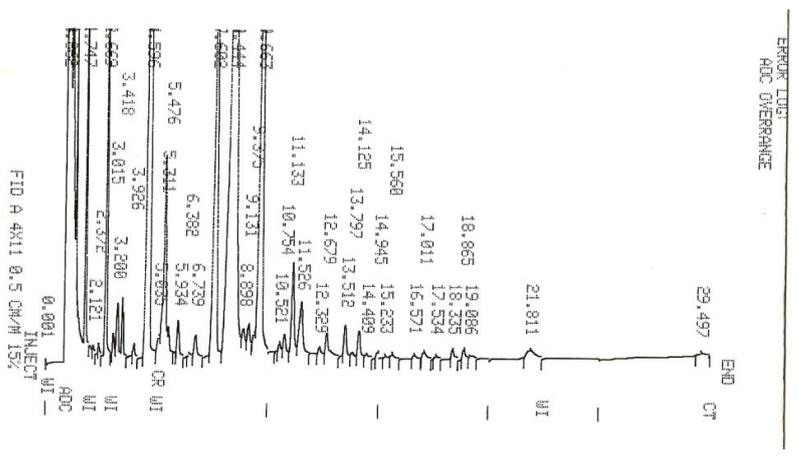


2



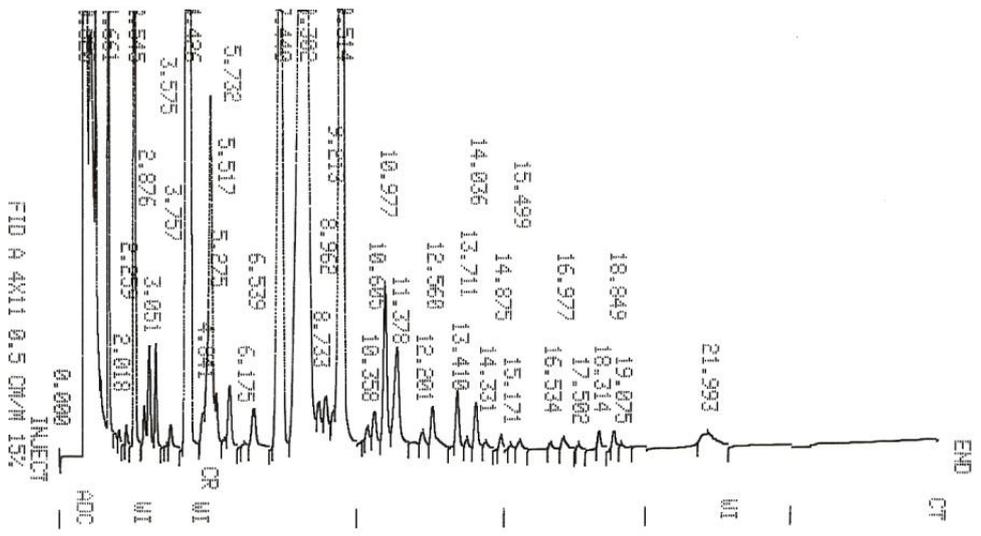
3

f) Leite pasteurizado – 120 dias

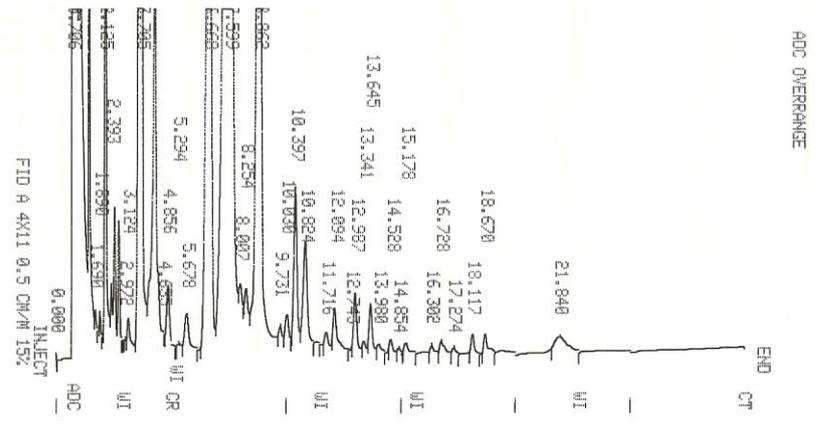


1

ERROR LOG:
ADC OVERRANGE

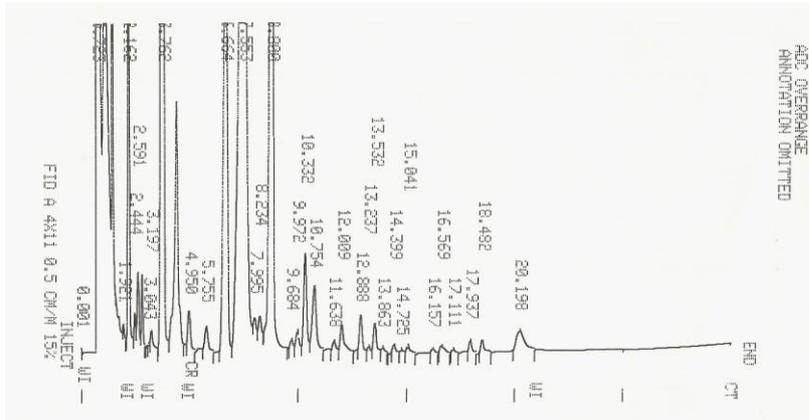


2

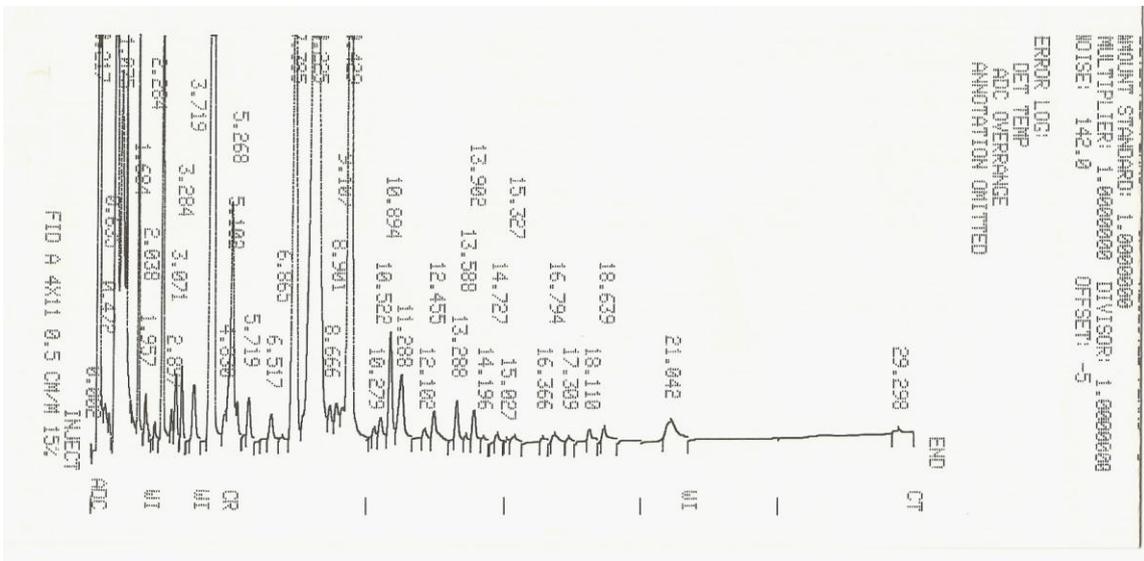


3

g) Leite pasteurizado – 150 dias

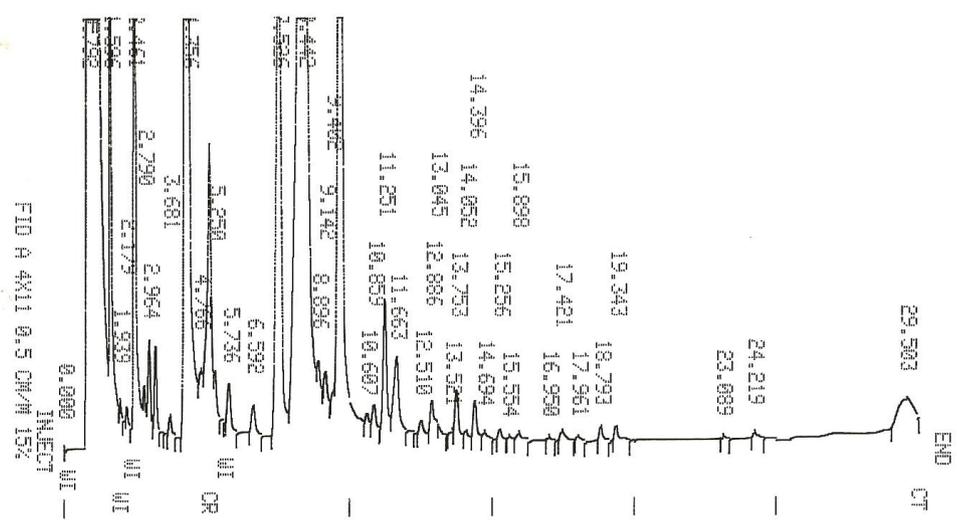


1



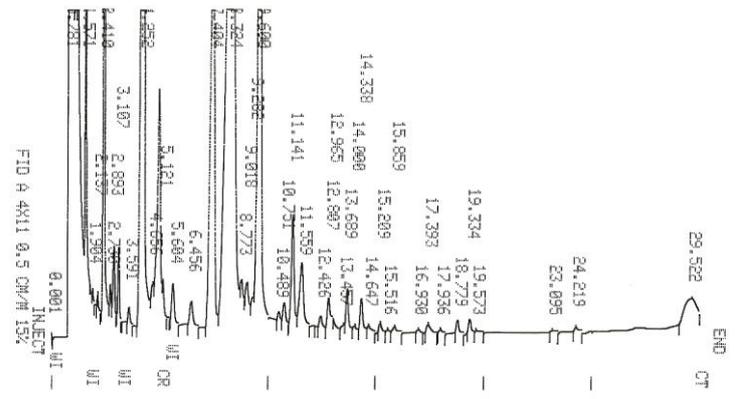
2

ANNOTATION OMITTED



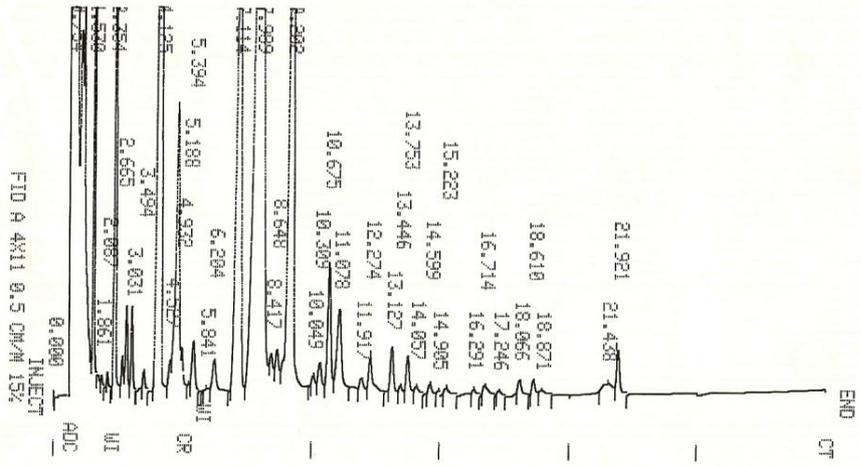
2

ERROR LOG:
ADC OVERRANGE
ANNOTATION OMITTED

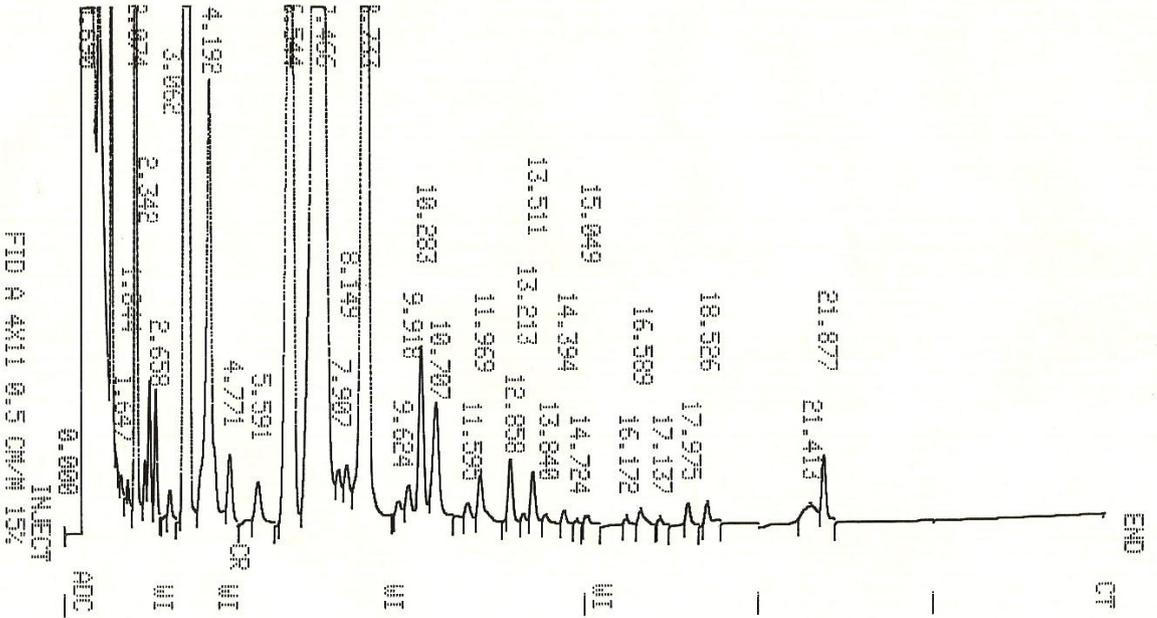


3

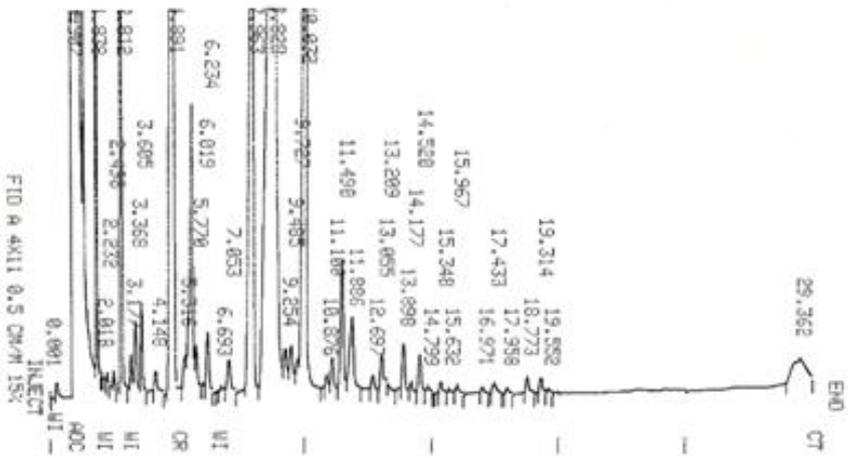
i) Leite pasteurizado – 210 dias



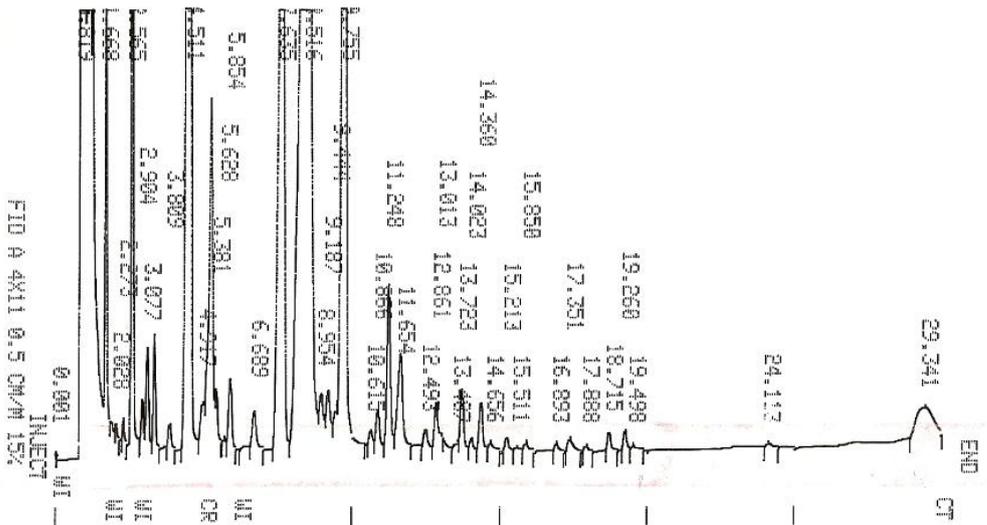
1



2



MULTIPLIER: 1.00000000 DIVISOR: 1.00000000
 NOISE: 142.0 OFFSET: -36
 ERROR LOG:
 DET TEMP
 AOC OVERRANGE
 ANNOTATION OMITTED



3

2

APÊNDICE D – TEMPOS DE RETENÇÃO E ÁREAS DOS ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS E INSATURADOS.

Tempos de retenção e áreas dos ácidos graxos saturados nas amostras de leite humano, para os tratamentos LC, T0, T90, T120, T150, T180, T210, T240.

Ácido graxo	Cáprico		Láurico		Mirístico		Palmitico		Esteárico		Araquídico	
	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área
LC	3378	3,9035	5657	4,4204	9925	9,3080	14376	43,5201	18210	14,0692	21567	0,5198
T0	3306	4,0417	5553	6,8402	6847	13,5438	14394	83,0678	18237	26,6379	21583	2,0215
T90	3322	2,0777	5585	6,0086	9891	10,2067	14388	41,7471	18245	11,2937	21788	0,3057
T120	3242	4,4819	5595	10,3243	9896	16,1418	14420	68,7143	18268	20,8943	21609	0,7463
T150	3368	3,3944	5649	8,4585	9943	13,9303	14436	59,1139	18273	16,9310	21629	0,6302
T180	3278	3,8063	5524	10,8247	9845	16,4547	14396	68,8570	18248	20,1904	21600	0,6691
T210	3526	2,9988	5902	9,9236	10229	15,0803	14696	62,9072	18516	18,3185	21864	0,6131
T240	3547	2,9988	5804	8,5864	10141	14,8585	14640	69,4148	18464	21,1398	21809	0,7299

TR=Tempo de retenção

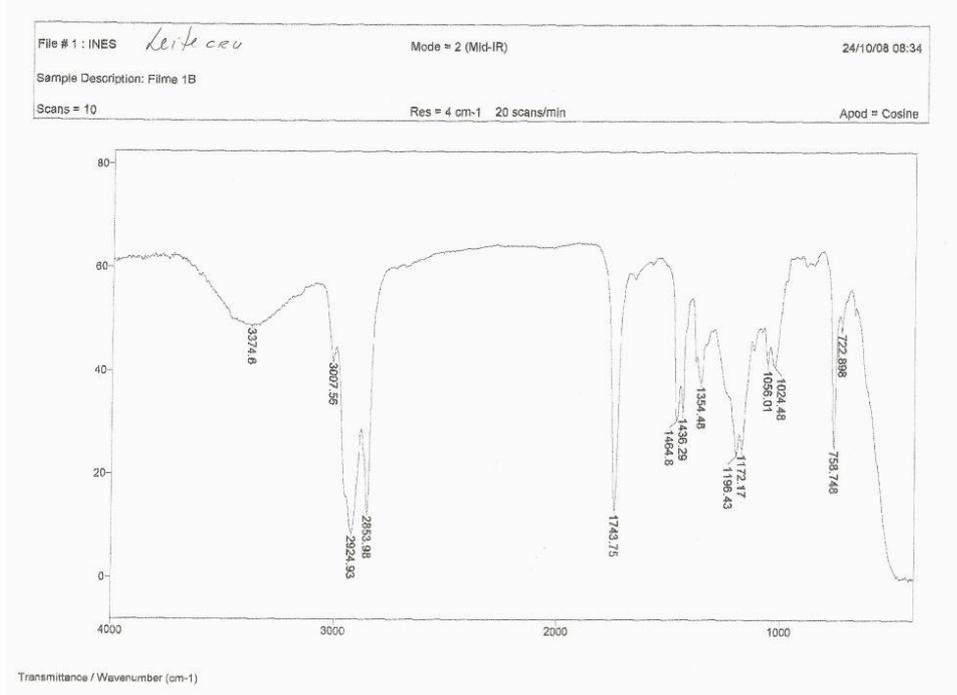
Tempos de retenção e áreas dos ácidos graxos insaturados nas amostras de leite humano, para os tratamentos LC, T0, T90, T120, T150, T180, T210, T240.

Ácido graxo	Palmitoleico		Oleico		Linoleico-ZZ		Linoleico-ZE		Linolênico	
	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área
LC	15423	3,5266	18798	59,6553	20469	24,6873	19931	0,4949	21149	0,2327
T0	15397	5,4898	19146	115,7090	20543	105,7586	19993	0,9715	21177	0,1905
T90	15448	3,8723	19136	55,6487	20512	19,5911	19974	0,5907	20512	0,0000
T120	15441	5,9331	19162	87,6567	20502	21,8015	19966	0,9922	21247	0,0730
T150	15467	5,6667	19182	88,2440	20545	40,2745	19987	1,1340	21497	0,0000
T180	15422	5,9604	19150	90,7139	20509	39,0918	19954	1,3276	21465	0,2838
T210	15724	6,1317	19245	90,8119	20788	41,4617	20228	1,1380	21745	0,2964
T240	15658	5,3098	19366	87,8047	20720	30,7177	19967	1,4124	21692	0,1195

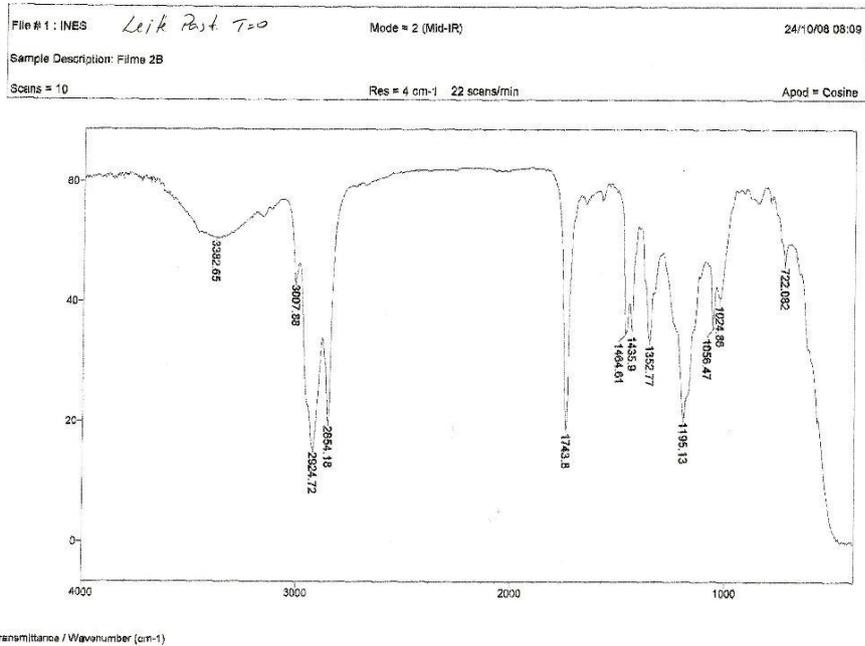
TR=tempo de retenção

APÊNDICE E – INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS DE LEITE HUMANO

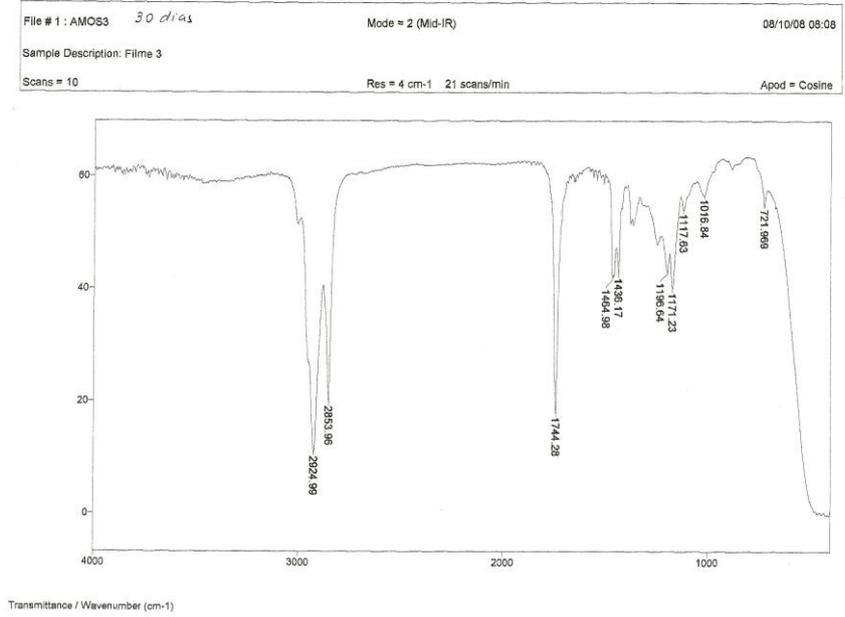
a) Leite cru



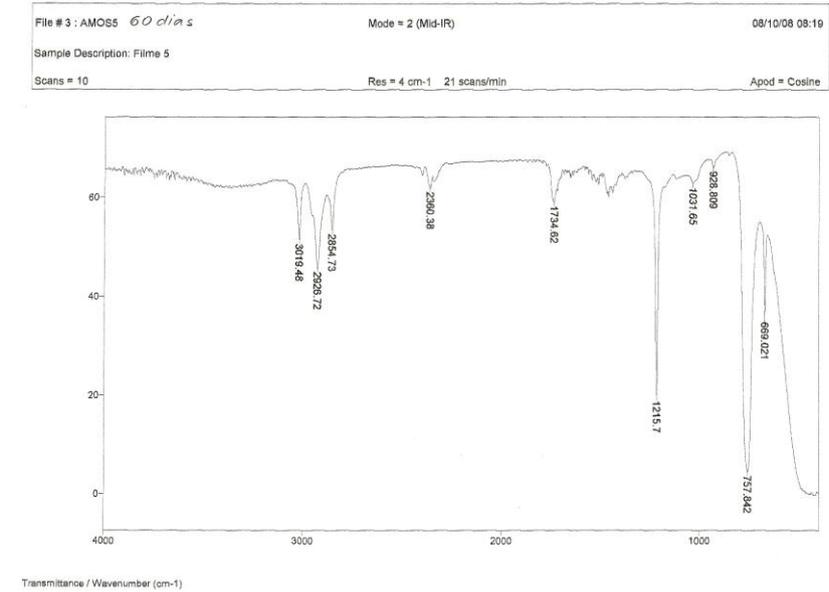
b) Leite pasteurizado – tempo zero



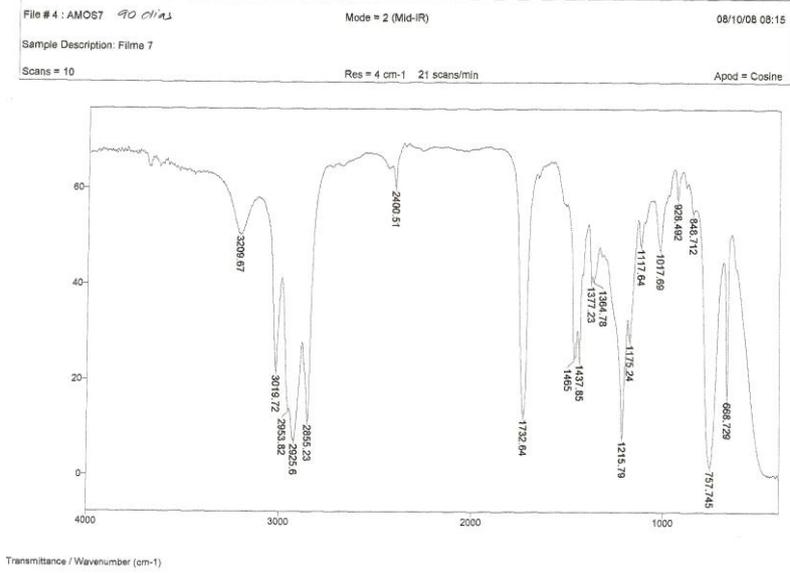
c) Leite pasteurizado – 30 dias



d) Leite pasteurizado – 60 dias

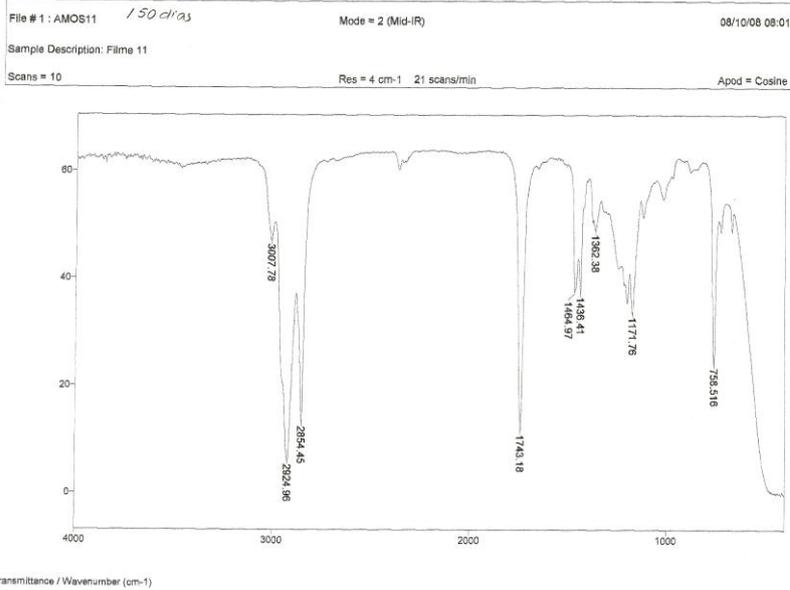


e) Leite pasteurizado – 90 dias

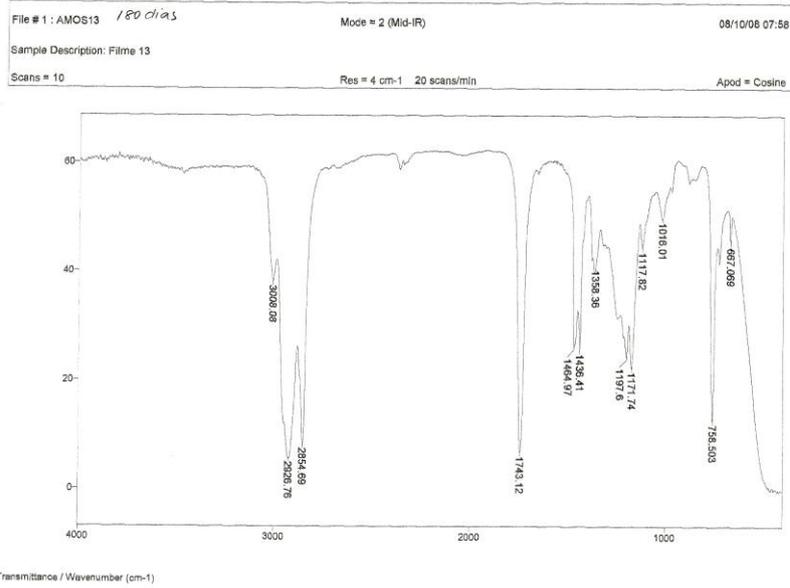


f) Leite pasteurizado – 120 dias - Desconsiderado

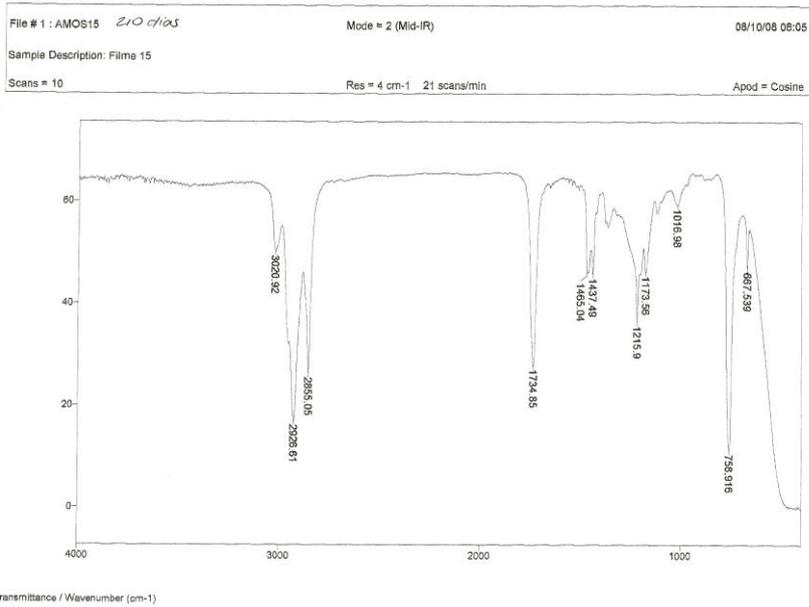
g) Leite pasteurizado – 150 dias



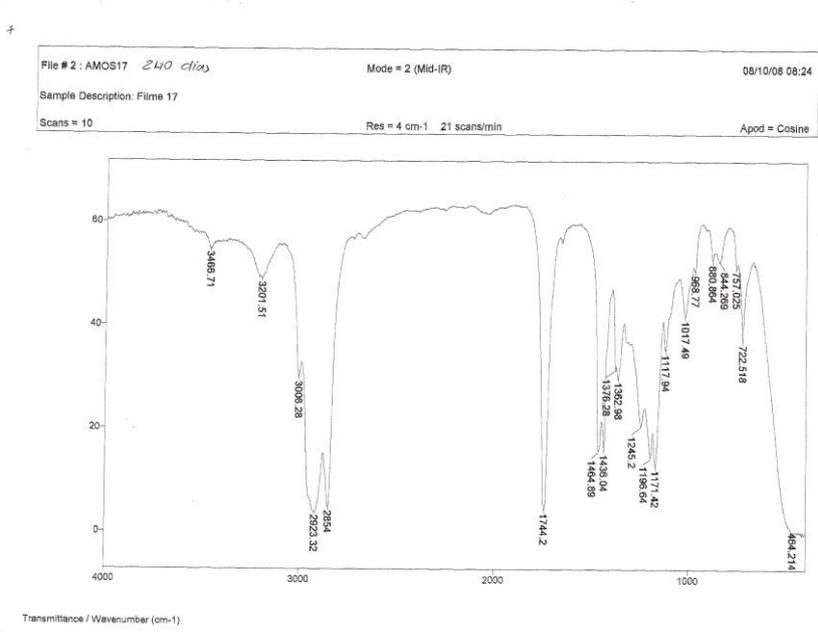
h) Leite pasteurizado – 180 dias



i) Leite pasteurizado – 210 dias

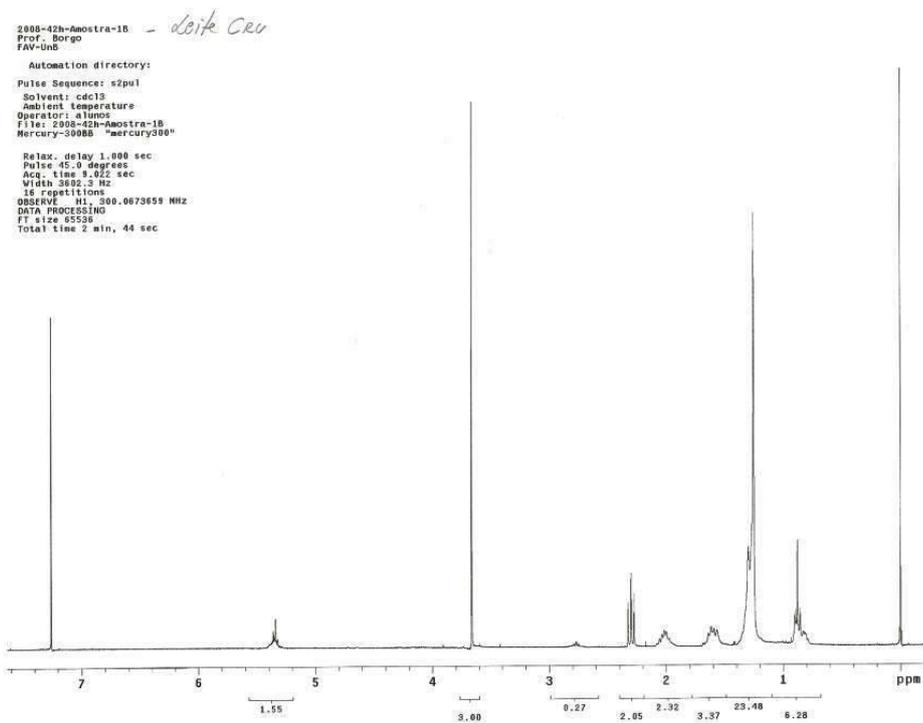
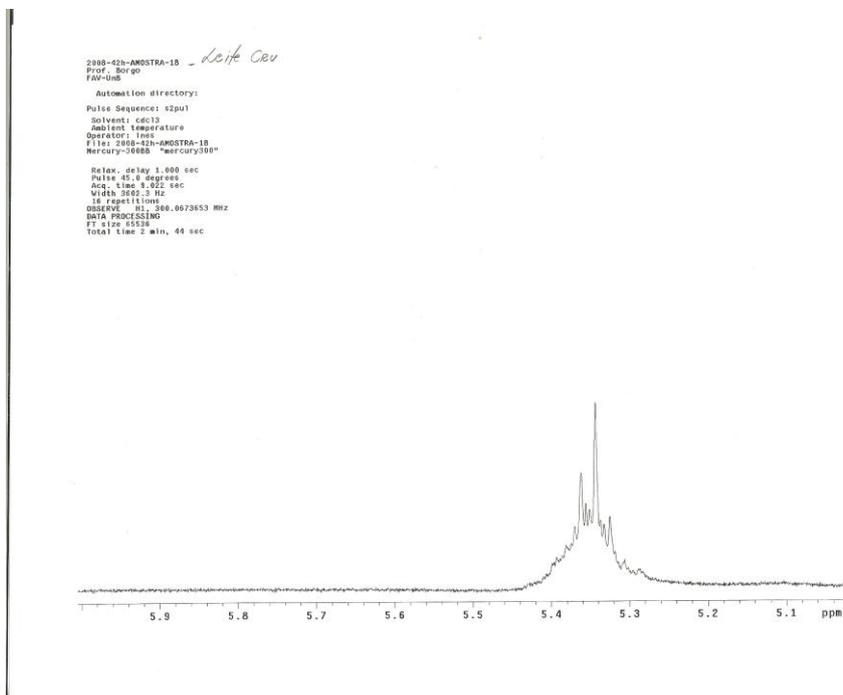


j) Leite pasteurizado – 240 dias



APÊNDICE F – RMN ¹H DAS AMOSTRAS DE LEITE HUMANO

a) Leite cru

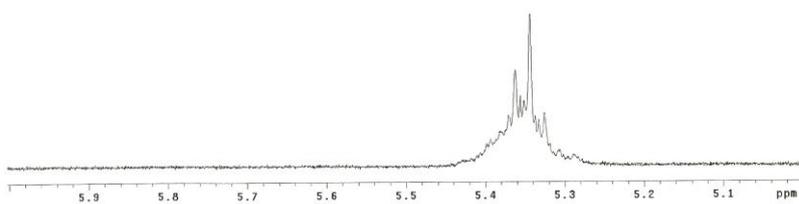


b) Leite pasteurizado – tempo zero

2008-42h-Amostra-28 - Leite Past. T=0
 Prof. Borgo
 FAN-100

Automation directory:
 Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: cdcl3
 Ambient Temperature
 Operator: alumpo
 File: 2008-42h-Amostra-28
 Mercury-30000 "mercury300"

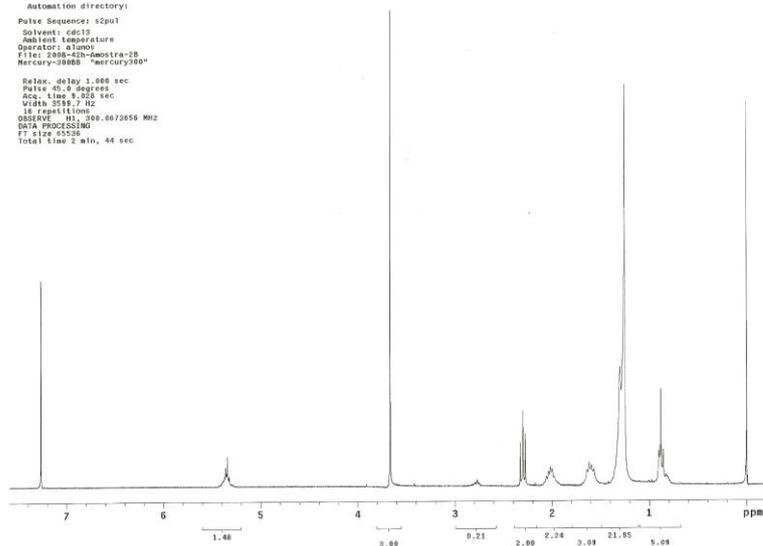
Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 8.320 sec
 Width 5599.7 Hz
 18 repetitions
 OBSERVE F1: 300.0673656 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 65536
 Total time 2 min, 44 sec



2008-42h-Amostra-28 - Leite Past. T=0
 Prof. Borgo
 FAN-100

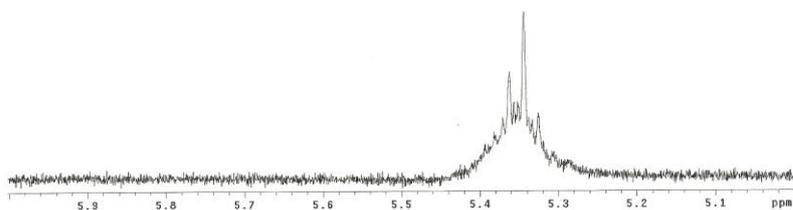
Automation directory:
 Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: cdcl3
 Ambient Temperature
 Operator: alumpo
 File: 2008-42h-Amostra-28
 Mercury-30000 "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 8.320 sec
 Width 5599.7 Hz
 18 repetitions
 OBSERVE F1: 300.0673656 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 65536
 Total time 2 min, 44 sec

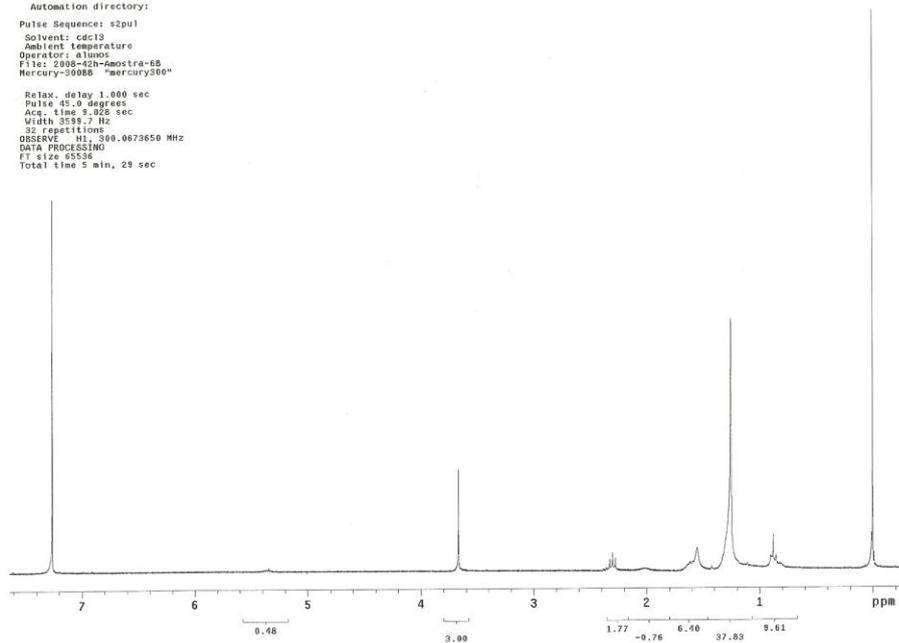


c) Leite pasteurizado – 30 dias

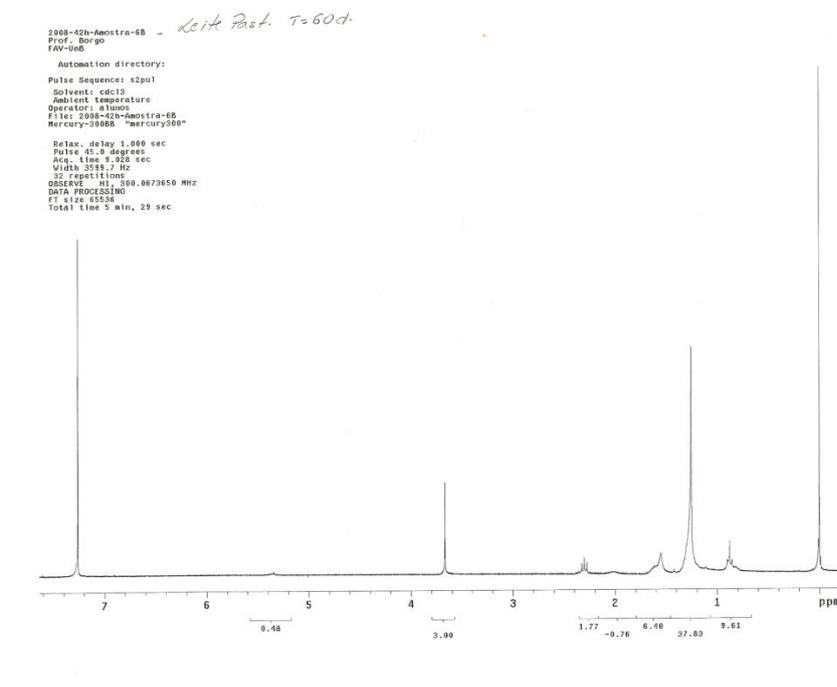
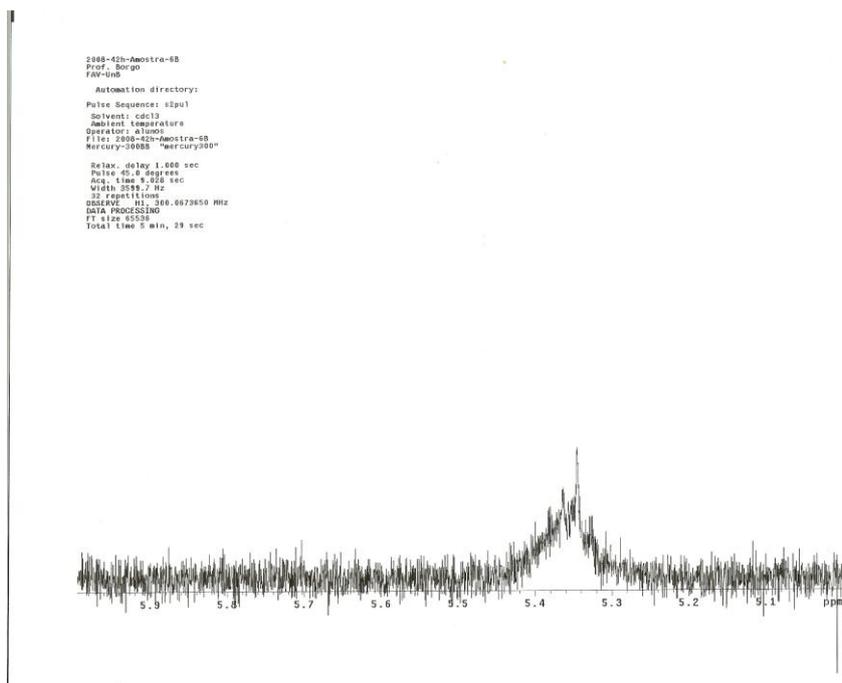
2088-02h-Amostra-48
 Prof. Borgo
 FAV-UnB
 Automation directory:
 Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: cdcl3
 Ambient temperature
 Operator: alamos
 File: 2088-02h-Amostra-48
 Mercury-3000B "mercury300"
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 9.825 sec
 Width 3598.7 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0673650 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 85536
 Total time 5 min, 29 sec



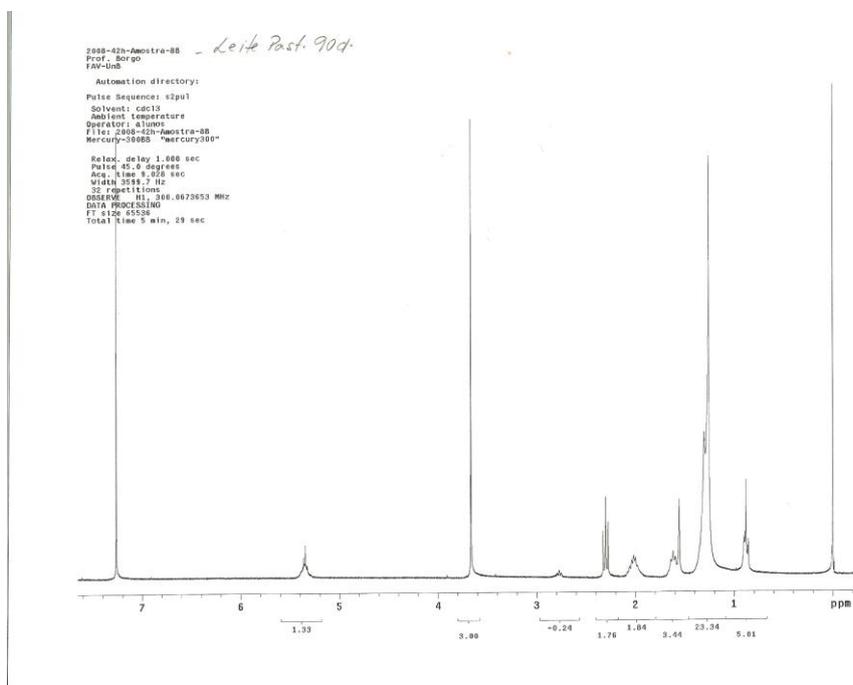
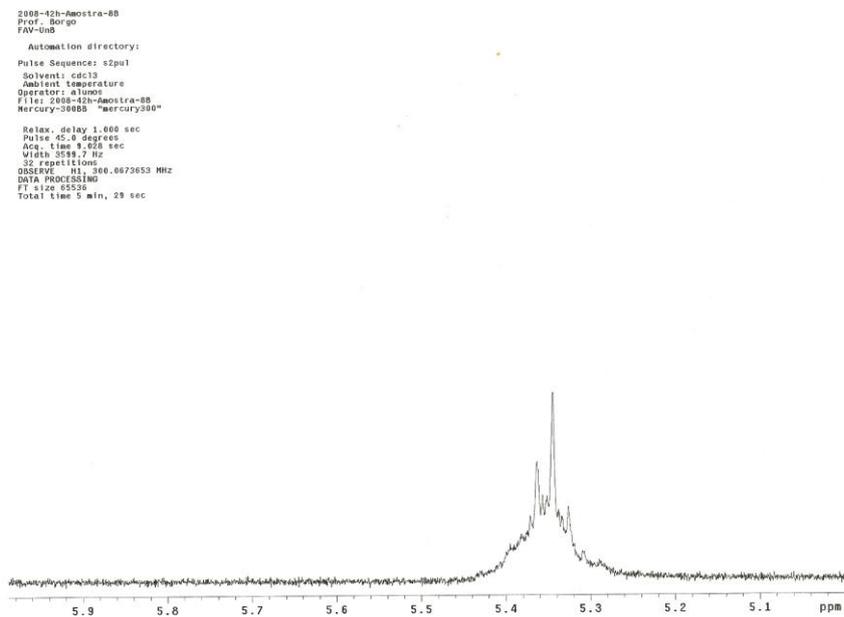
2088-02h-Amostra-68 - Leite Past. T=60d.
 Prof. Borgo
 FAV-UnB
 Automation directory:
 Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: cdcl3
 Ambient temperature
 Operator: alamos
 File: 2088-02h-Amostra-68
 Mercury-3000B "mercury300"
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 9.925 sec
 Width 3598.7 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0673650 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 85536
 Total time 5 min, 29 sec



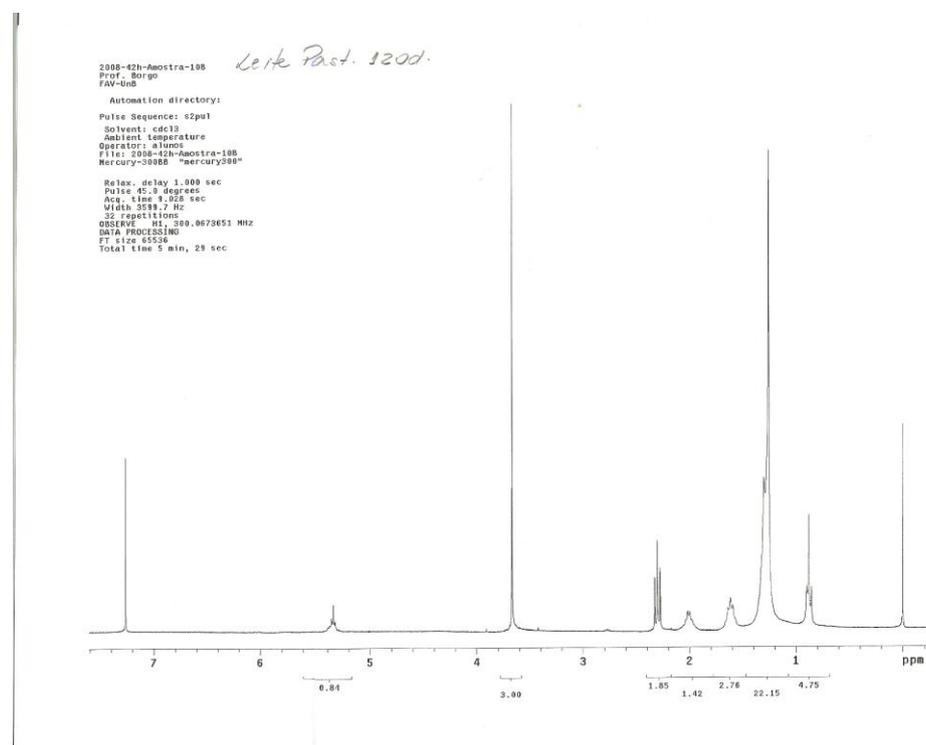
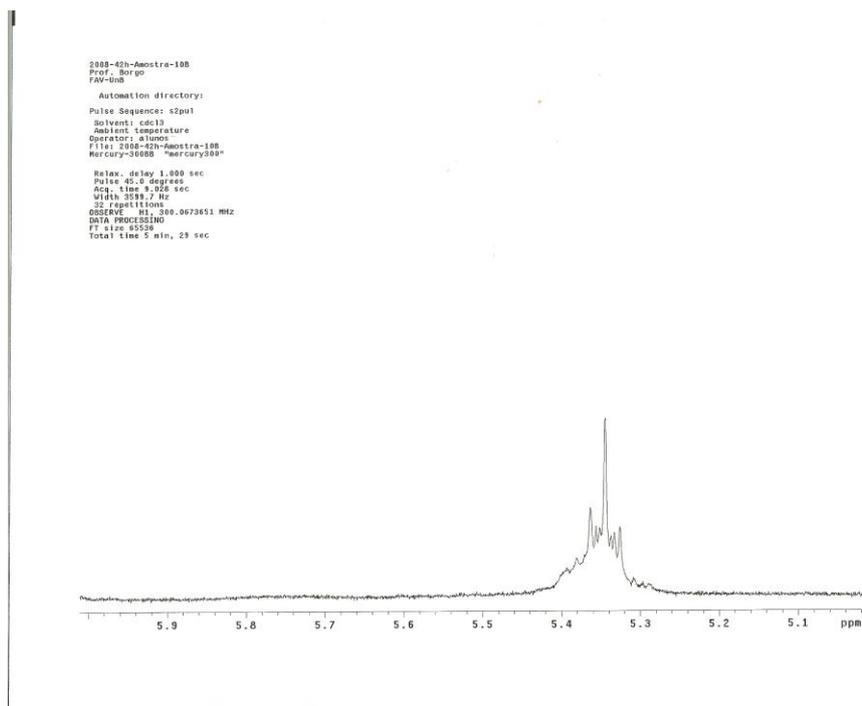
d) Leite pasteurizado – 60 dias



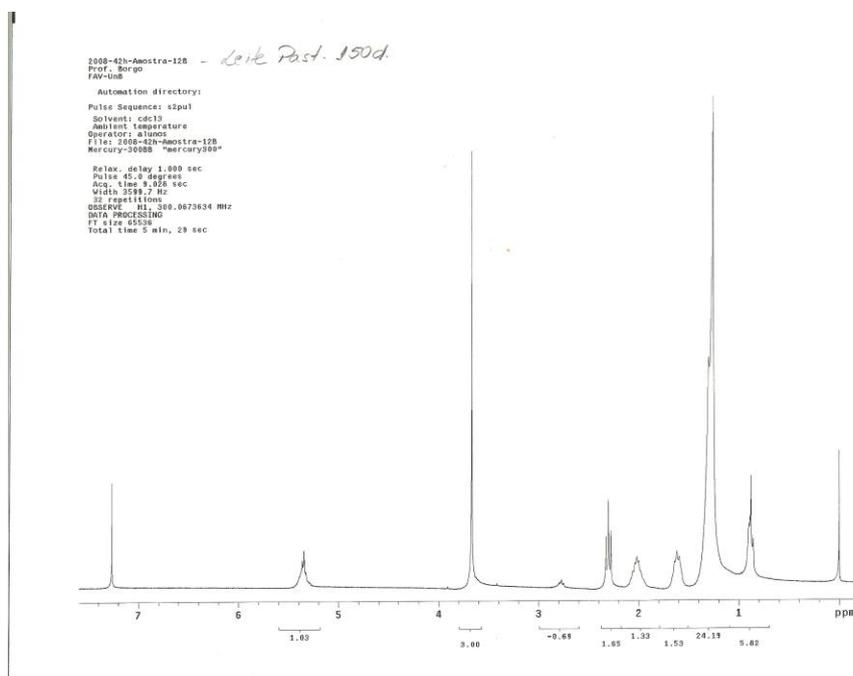
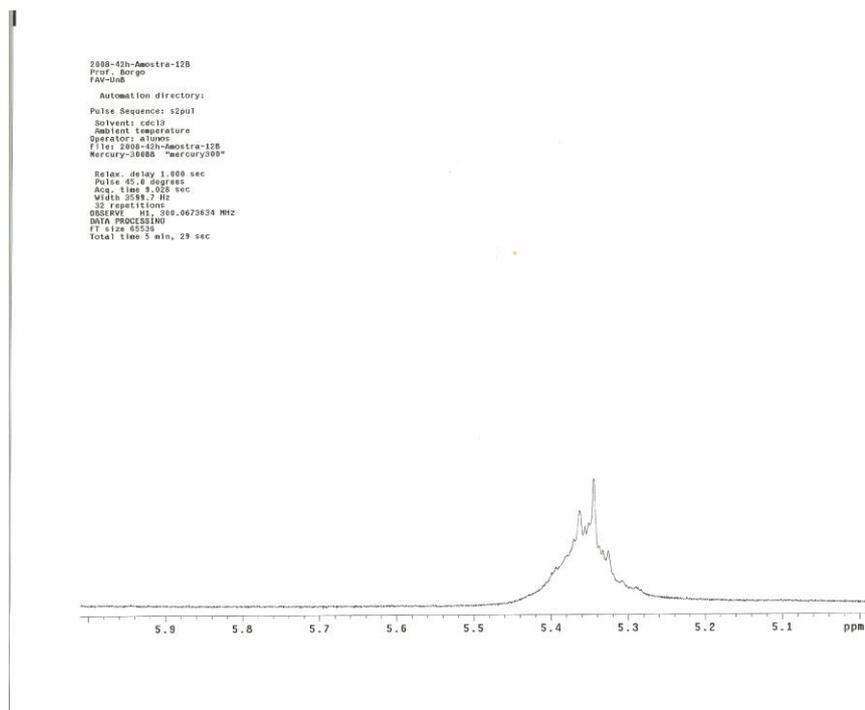
e) Leite pasteurizado – 90 dias



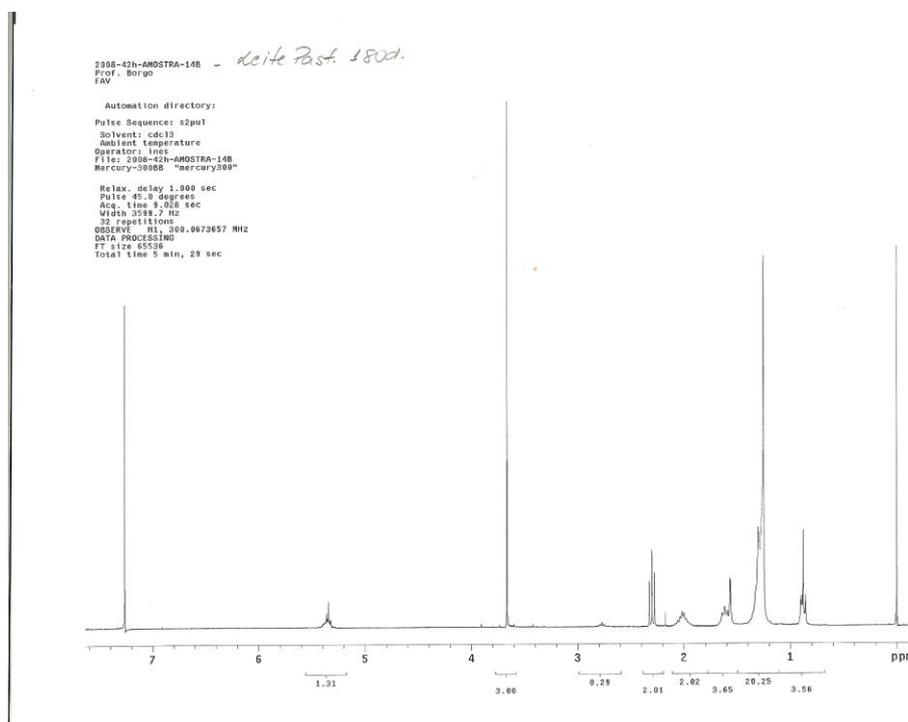
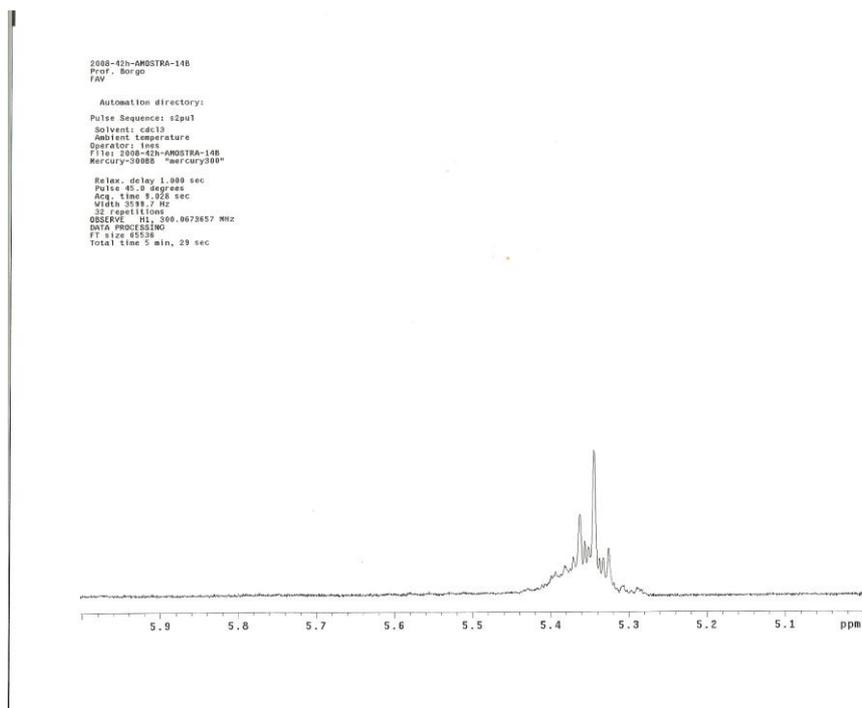
f) Leite pasteurizado – 120 dias



g) Leite pasteurizado – 150 dias



h) Leite pasteurizado – 180 dias



i) Leite pasteurizado – 210 dias

2008-42h-AMOSTRA-168
Prof. Borgo
FAV

Automation directory:

Pulse Sequence: t2pu1

Solvent: cdcl3

Ambient temperature

Operator: ines

File: 2008-42h-AMOSTRA-168

Mercury-3000 Mercury3000

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 6.772 sec

Width 3588.7 Hz

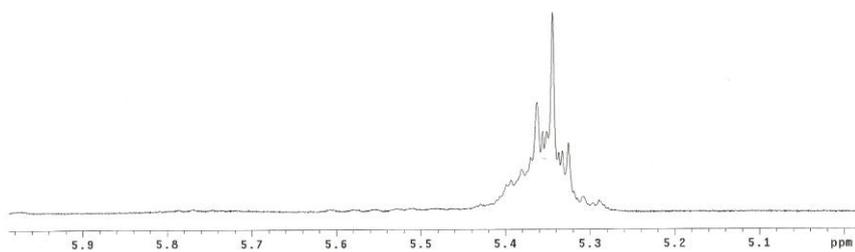
32 repetitions

ORSEPRG: RL 300.0673647 MHz

DATA PROCESSING

FT size 65536

Total time 4 min, 15 sec



2008-42h-AMOSTRA-168 - Leite Past. 210d.
Prof. Borgo
FAV

Automation directory:

Pulse Sequence: t2pu1

Solvent: cdcl3

Ambient temperature

Operator: ines

File: 2008-42h-AMOSTRA-168

Mercury-3000 Mercury3000

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 6.772 sec

Width 3588.7 Hz

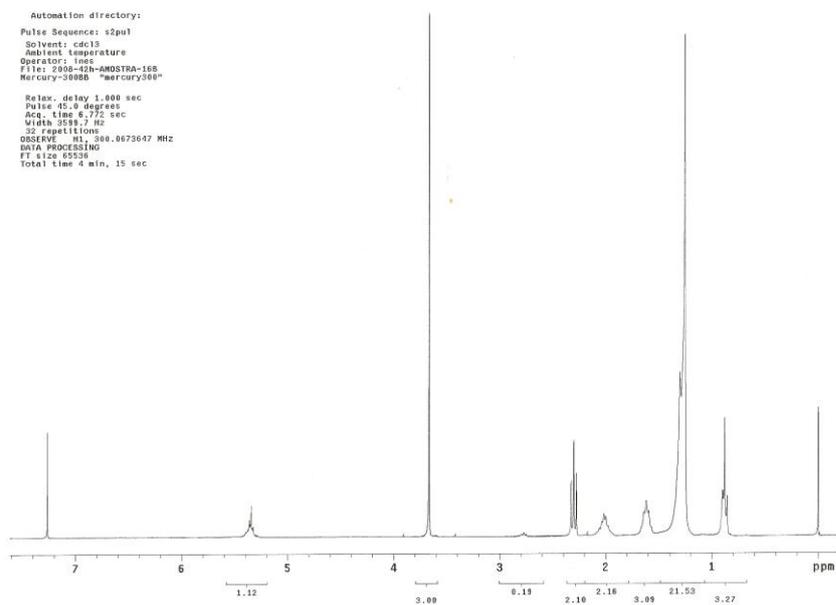
32 repetitions

ORSEPRG: RL 300.0673647 MHz

DATA PROCESSING

FT size 65536

Total time 4 min, 15 sec

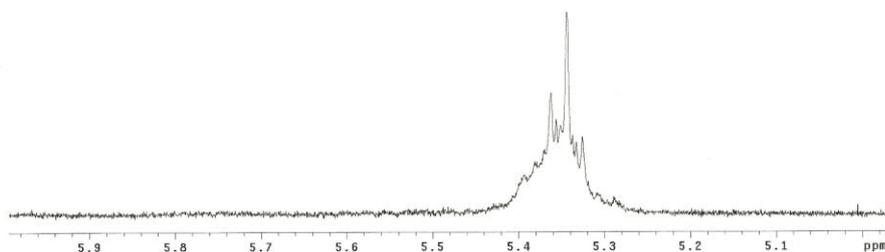


j) Leite pasteurizado – 240 dias

2008-42h-AMOSTRA-188
 Prof. Borgo
 FAV

Automation directory:
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: cdc13
 Ambient temperature
 Operator: Ines
 File: 2008-42h-AMOSTRA-188
 Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 9.928 sec
 Width 3599.7 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE H1 300.0673656 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 65536
 Total time 5 min, 29 sec

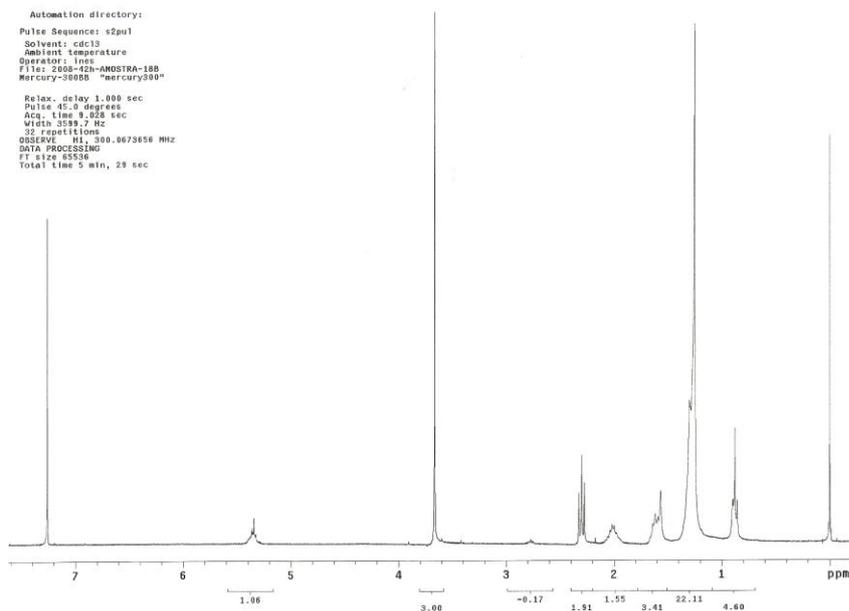


2008-42h-AMOSTRA-188
 Prof. Borgo
 FAV

- Leite Past 240d

Automation directory:
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: cdc13
 Ambient temperature
 Operator: Ines
 File: 2008-42h-AMOSTRA-188
 Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 9.928 sec
 Width 3599.7 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE H1 300.0673656 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 65536
 Total time 5 min, 29 sec



ANEXO A – APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 072/2005

Título: "Efeito da pasteurização e da vida de prateleira sob o congelamento sobre a fração lipídica do leite materno ordenhado"

Pesquisador responsável: Luiz Antônio Borgo

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de Responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es)

Data de entrada: 28/09/2005

Proposição do(a) relator(a)

() Aprovação

(x) Aprovação com recomendação

() Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 10/11/2005

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 07/12/2005

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96, que regulamenta a matéria, a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR com recomendação**, em sua 10ª Reunião Ordinária de 2005, realizada no dia 07/12/2005, de acordo com o parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Observações:

1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;

2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 20 de dezembro de 2005.

Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coord. do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina - UnB