

Efeito da liofilização do leite humano cru e pasteurizado sobre os níveis de glutamina

Effect of freeze-drying raw and pasteurized human milk on glutamine levels

DOI: 10.34117/bjdv8n5-204

Recebimento dos originais: 21/03/2022

Aceitação para publicação: 29/04/2022

Soraia Silva de Souza

Mestre em Ciências da Saúde

Instituição: Universidade do Estado de Mato Grosso – Faculdade de Medicina

Endereço: Rua Dez de Março, 151 Bairro Bosque da Saúde II, Cuiabá / MT

E-mail: soraiassouza@terra.com.br

Adelson Joel da Silva

Doutorado em Ciências

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso, Biológica - Faculdade de Biologia

Departamento de Biologia e Zoologia

Endereço: Rua Quarenta e Nove, 2367 – Boa Esperança – Cuiabá / MT

E-mail: adelsonjoel@gmail.com

Carlos André Ricart

Doutorado em Bioquímica

Instituição: Universidade de Brasília - Departamento de Biologia Celular - Instituto de Ciências Biológicas - Brasília – DF – Brasil

Endereço: Asa Norte Brasília, DF

E-mail: carlos.ricart@gmail.com

Maria de Fatima Carvalho Ferreira

Doutorada em Ciência da Saúde

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso - Departamento da Pediatria

Hospital, Universitário Júlio Muller

Endereço: Rua Quarenta e Nove, 2367 – Boa Esperança – Cuiabá / MT

E-mail: fatimafferreierabr@gmail.com

Fhelipe Jolner Souza Almeida

Mestrado em Ciências da Saúde

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso – Departamento de Química

Endereço: Rua Quarenta e Nove, 2367 – Boa Esperança – Cuiabá / MT

E-mail: fhelipejolner@gmail.com

Cervantes Caporossi

Doutorado em Medicina

Instituição: Centro Universitário de Várzea Grande - Faculdade de Medicina

Departamento de Pesquisa

Endereço: Rua Quarenta e Nove, 2367 – Boa Esperança – Cuiabá / MT

E-mail: caporossi@terra.com.br

1 INTRODUÇÃO

O leite materno (LM) é um fluido biológico complexo e suficiente para suprir todas as necessidades nutricionais do recém-nascido (RN) durante os primeiros seis meses de vida. Apesar da alimentação materna variar enormemente, o LM, surpreendentemente, apresenta composição semelhante para todas as mulheres do mundo que amamentam, sendo exceção apenas para as mães com desnutrição grave. A composição nutricional balanceada é constituída por proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais ¹.

Desde o nascimento até suspender a amamentação, a mãe produz o leite necessário e fisiologicamente adaptado para cada etapa do desenvolvimento, sendo dividido em três fases principais: colostro, leite de transição e finalmente uma produção com volume em médio de 700 a 900 ml/dia a partir do 15º dia do leite maduro ².

O surgimento do Rede do Banco de Leite Humano (RBLH), representa um importante avanço para a alimentação dos recém-nascidos cujo o objetivo pressuposto é armazenar o Leite Humano pasteurizado e o distribuir para RN, de acordo com a necessidade. Dentre outros objetivos, o Banco de Leite Humano (BLH) complementa o volume insuficiente do LH para algumas mães em específico para os recém nascidos prematuros ³.

Segundo os autores Valentine CJ et al ⁴, as recomendações atuais enfatizam que o recém-nascido pré-termo deve receber leite materno ou leite materno doado ao Banco de Leite Humano, além de fortificantes comerciais para melhorar a composição do leite, uma vez que o leite humano é a única fonte nutricional do lactante.

Nesta fase da vida em determinadas evoluções, há complicações clínicas e o recém-nascido tem necessidade de utilização de terapia nutricional enteral. Entretendo, o composto nutricional é representado geralmente pelo leite humano pasteurizado.

Para os autores Snoj Tratnik J et al ⁵, o leite materno fornece nutrientes ideais e fatores de proteção que melhoram os sistemas imunológico e gastrointestinal, bem como oferece suporte ao neurodesenvolvimento de longo prazo de bebês prematuros.

Para a população neonatal, principalmente prematuro ou RN em estado crítico, o início da terapia nutricional nas primeiras 24 a 48 horas de admissão em unidade de terapia intensiva (UTI) é fundamental e quando possível, a terapia nutricional enteral é administrada isolada ou associada à terapia parenteral, para sustentar a compensação da carga catabólica imposta pela doença crítica ^{3,6}. Para uma resposta ao processo infeccioso

é fundamental uma modulação da resposta imune, ação que envolve inúmeros órgãos e componentes, com destaque aos imunonutrientes e entre estes a glutamina (GLN) ⁷.

A GLN representa o principal aminoácido transferido para o feto por meio transplacentário entre mãe, placenta e feto, e constituem um dos aminoácidos mais abundantes no leite materno. Entretanto bebês nascidos prematuramente sofrem interrupção abrupta do fornecimento placentário de glutamina, o que acarreta em dependência exclusiva de fornecimento por terapia nutricionais, sendo que a concentração de glutamina livre é encontrada naturalmente na composição no leite materno ⁸.

O processo da pasteurização é capaz de inativar até 100% dos microrganismos patogênicos, 99,9% da microbiota saprófito do leite materno são totalmente destruídos pelo calor, motivo pelo qual o leite materno pasteurizado é seguro para introdução aos recém-nascidos na UTI ⁹.

Segundo Savino F et al ¹⁰, os produtos que passam por um processo de liofilização (freeze-drying), caracterizam-se por terem baixo peso, em função da retirada da água, conservam-se mesmo em temperatura ambiente e quando reconstituídos recuperam suas propriedades originais.

Uma recente pesquisa realizada por Néia V. et al ¹¹, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), analisou amostras de leite humano cru de doadoras do Banco de Leite Humano do Hospital Universitário de Maringá. O objetivo do estudo foi obter o leite humano em pó por diferentes tecnologias, avaliar componentes nutricionais e imunológicos após os processamentos e avaliar a viabilidade do uso do leite humano em pó na Rede de Bancos de Leite Humano. O estudo foi realizado com amostras de leite humano cru (colostró, transição e maduro) de doadoras do Banco de Leite Humano do Hospital Universitário de Maringá. As amostras foram subdivididas em doze grupos sendo classificados após os processamentos como: colostro cru, colostro pasteurizado, colostro liofilizado, colostro *spray-drying*, transição cru, transição pasteurizado, transição liofilizado, transição *spray drying*, maduro cru, maduro pasteurizado, maduro liofilizado e maduro *spray-drying*. As amostras foram submetidas a análise de composição de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama (CG-DIC), perfil de triacilgliceróis por Espectrometria de Massa com Ionização por Electrospray por Infusão Direta (ESI-MS) e concentrações séricas de citocinas por Citometria de Fluxo.

Neste outro estudo Oliveira MM et al ¹², analisaram a partir da liofilização direta do leite materno e leite materno concentrado (LHM) demonstrando segurança

microbiológica, osmolaridade aceitável e composição nutricional adequada dos principais macro e micronutrientes, além do aumento significativo apenas nos elementos essenciais Manganês e Selênio. O teor de micronutrientes essenciais no concentrado de LHM foi semelhante ou superior ao do leite materno pré-termo, o que sugere que é viável para o suporte nutricional de bebês prematuros.

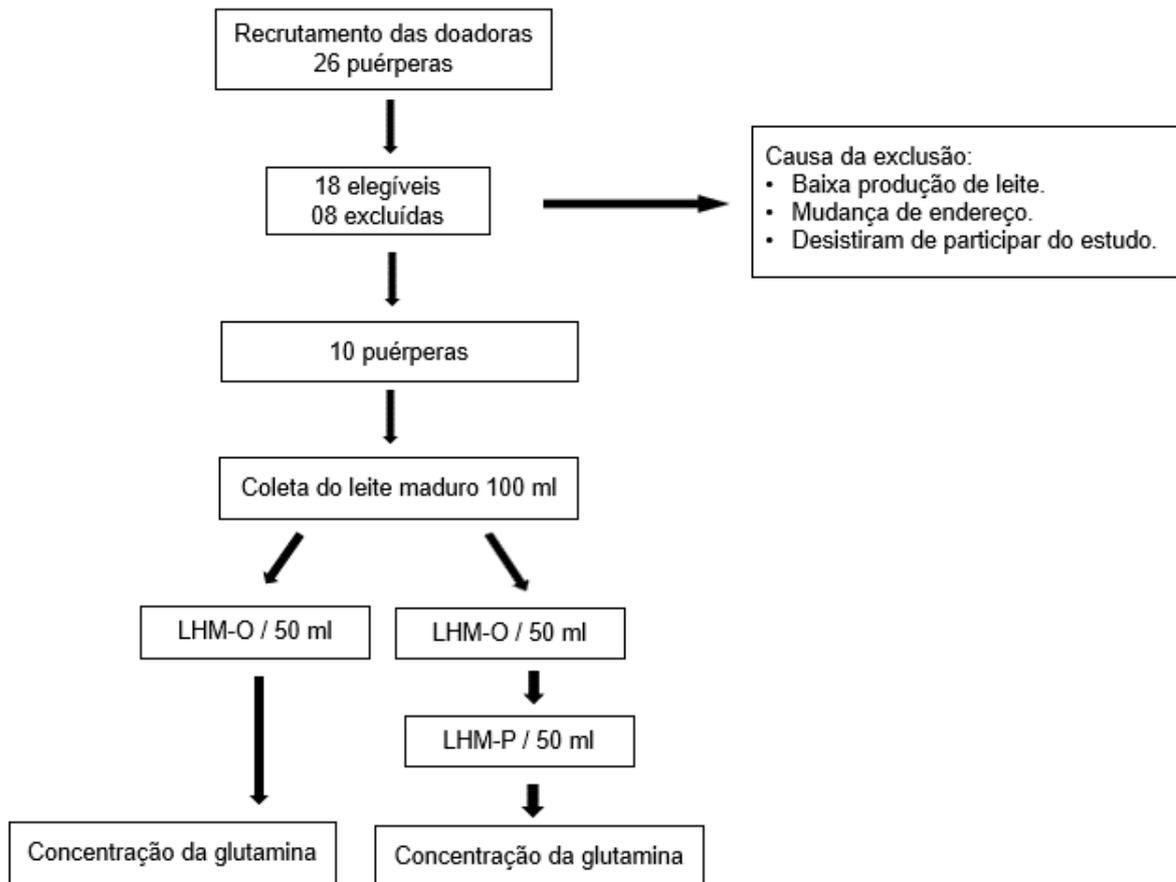
Embora existam estudos acerca da quantidade de glutamina no leite de mães de recém-nascidos a termo, não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliam as concentrações desse aminoácido no leite humano pasteurizado e liofilizado.

Neste contexto o nosso estudo deve como objetivo avaliar a concentração da glutamina do leite humano maduro liofilizado e o leite humano maduro cru e após o processo de pasteurização e liofilização.

2 MÉTODOS

O estudo está conforme os princípios éticos aprovados pelo comitê de ética de pesquisa da UFMT, registrado sob o protocolo de número 23108.049789/14-9 e submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Plataforma Brasil, parecer nº 1.083.955. Foi realizado a coleta de dados, amostra do material em estudo nos serviços de Ginecologia e Obstetrícia e no Banco de Leite Humano do Hospital Universitário Júlio Muller, avaliando o leite materno de mães em aleitamento materno exclusivo aos recém-nascidos. Conforme apresentada na figura 1, foram recrutadas 26 puérperas, 18 delas foram eleitas. Entretanto por fatores diversos ocorreram desistências ou exclusões da pesquisa tais como: mudança de endereço, telefone desconhecido e baixa produção de leite. Assim permaneceram no estudo 10 puérperas; para a análise da glutamina, foi padronizado o volume de 50 ml de cada amostra em cada estágio.

A figura 1: apresenta o primeiro fluxo do estudo para o recrutamento das puérperas, coleta do leite materno e preparo das amostras.



O estudo foi realizado a partir de um instrumento, utilizado para recrutamento das doadoras por um questionário estruturado e adaptado de uma diretriz para aplicação da pesquisa ¹³ (**Anexo 1**). Posteriormente foram analisados os prontuários e o cartão da gestante para avaliar os exames realizados durante o pré-natal. Foram avaliados dados antropométricos como: peso pré-gestacional, ganho de peso gestacional e estatura; hábitos alimentares de frequência alimentar através de recordatório durante a gestação. Após alta hospitalar continuamos a acompanhá-las no ambulatório e/ou residência, para realizar a ordenha do leite materno a partir do 15º dia do puerpério.

O estudo foi realizado em três etapas: 1) coleta do leite humano cru; 2) preparo das amostras: a) pasteurização e b) liofilização; 3) análise da glutamina.

Respeitando técnica padronizada ⁹, foi coletado leite materno maduro, uma primeira amostra com 50 ml cada por doadora, sendo coletada a partir do 15º dia do puerpério uma segunda amostra com 50 ml por doadora para o processo de pasteurização, foi realizado de acordo o protocolo padronização e recomendados pela Rede Brasileira de BLH. (disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br>).

a) Processo de pasteurização

Em conformidade com as técnicas padronizadas, foram coletadas duas amostras com 100ml do total de cada doadora, a primeira no décimo quinto dia e a segunda a partir do 15º dia. As amostras foram transportadas em caixa térmica com a temperatura em constante medição com termômetro digital, mantendo a temperatura entre +2°C e +8°C. De cada coleta por doadora uma amostra com 50 ml foi pasteurizada (LHP) de acordo com o protocolo padronizado pelo Banco de Leite e recomendado pela Rede Brasileira de BLH (disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br>).

a.1) Processo de liofilização

O processo de liofilização a que foram submetidas as amostras, uma amostra de LHC e outra amostra de LHP, ocorreu em um processo contínuo com duração de 72 horas, utilizando-se o equipamento “Liofilizador LS 3000” do fabricante Terroni Ltda, conforme foto, na figura 2, do equipamento utilizado. O resultado foi a amostra sólida com granulometria reduzida.

Fotografia 2: Processo de liofilização do leite humano cru



Fonte: Laboratório de bioquímica

b) Análise da Glutamina

c.1) Preparação das amostras

Como primeiro passo, cada uma das amostras liofilizadas (LHC e LHP) foram pesadas, de cada uma foram retiradas 2g e identificadas; para a retirada de toda a gordura do leite, aplicou-se o processo de lavagem com éter de petróleo e filtragem em papel filtro, para maior qualidade da lavagem as amostras foram submetidas a duas lavagens, a

primeira em 10ml de éter de petróleo e a segunda em 5ml; após o processo de filtragem as amostras ficaram em descanso por 30 minutos para a completa volatilização do solvente, após as amostras foram armazenadas em tubos (ependorfs). Todo o processo de manuseio das amostras foi realizado em capela de exaustão, utilizando também equipamento estéril, seguindo as normas de biossegurança prevista para o procedimento.

c.2) Análise da Glutamina

Para análise do aminoácido (AA) foi usado o kit do fabricante SIGMA-ALDRICH para determinação de glutamina/glutamato, o mesmo foi mantido em temperatura de armazenamento 2-8°C, conforme orientação do fabricante. A medição ocorreu através da espectrofotometria de L-glutamina e/ou L-glutamato por determinação enzimática de L-glutamina e desidrogenação de L-glutamato com conversão de NAD a NADH. Cada uma das amostras foi reconstituída em água e divididas em três partes iguais (poços) em duas reações A e B, conforme o protocolo. Leu-se a absorbância a 340 nm após 40 minutos e/ou até que a absorbância permaneça constante. Subtraindo absorbância de fundo desta leitura para absorbância líquida. Curva Padrão de Glutamina: Padrões de L-glutamina usando mmoles vs. absorbância.

3 RESULTADOS

Tabela 1: Dados demográficos e o tipo de parto e idade gestacional das puérperas.

PUÉRPERA	IDADE (anos)	PESO (Kg)	ALTURA (m)	IG (semanas)	IMC (kg/m²)	T P
P1	22	75	1,62	41,0	28,57	N
P2	20	57	1,57	39,0	23,12	N
P3	21	59	1,59	40,0	23,33	N
P4	22	72	1,63	37,0	27,09	N
P5	34	68	1,56	39,0	27,94	C
P6	24	67	1,57	39,5	27,18	N
P7	26	60	1,53	38,0	25,63	C
P8	18	64	1,66	37,0	23,22	C
P9	33	74	1,62	40,0	28,19	C
P10	34	69	1,71	39,0	23,59	N
MÉDIA EPM	25,40 + 1,93	66,50 + 2,01	1,60 + 0,01	38,95+ 0,41	25,79 + 0,71	N=60% C= 40%

IG: Idade gestacional; IMC: Índice de massa corporal; TP: Tipo de parto; C: Cesariana; N= Normal; Kg: Quilogramas; m: metros; EPM: Erro padrão da média.

A idade média foi de 22 a 34 anos, o IMC 26,79 kg/m², a idade gestacional de 39,95 semanas, e relação ao tipo de parto normal e cesariano os dados foram respectivamente 60% e 40% (**tabela 1**).

Tabela 2: Perfil dos recém-nascidos do estudo.

VARIÁVEL	MÉDIA + EPM
Peso (Kg)	3,29 + 0,08
Comprimento (cm)	51,85 + 1,09

Kg: Quilogramas; cm: centímetro;
EPM: Erro padrão da média.

Em relação aos recém-nascidos, 70% eram do sexo feminino e 30 % do sexo masculino, com peso médio de 3,29kg e comprimento de 51,85 centímetros (**tabela 2**).

A concentração de glutamina nos grupos LHMCL e LHMPL, foi semelhante, conforme representados os dados na (**tabela 3**).

Grupos	Média ± EPM
Grupo - LHMCL	1,80 ± 0,33
Grupo - LHMPL	1,93 ± 0,44

Teste *t* de Student para amostras independentes com nível de significância de $\alpha = 5\%$. Letras iguais nas colunas significam ausência de diferença estatística ($p = 0,825$).

LHMCL: leite humano maduro cru liofilizado; LHMPL: leite humano maduro pasteurizado e liofilizado; EPM: Erro padrão da média. (**tabela 3**).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com os levantamentos dos dados do tipo de parto, idade gestacional das puérperas e perfil dos recém nascidos, analisamos a concentração do aminoácido no leite humano a partir do liofilizado obtido de leite humano maduro cru e após a pasteurização, apresentando dados sobre a concentração do aminoácido glutamina presente nos grupos leite humano cru liofilizado e leite humano pasteurizado e liofilizado.

Em um ambiente de UTI neonatal, onde recém natos com algumas complicações clínicas, careciam de uma terapia nutricional pelos componentes essenciais presentes naturalmente no leite materno que fortalecem o sistema imunológico ⁴.

Todavia a nutrição em recém nascidos prematuros muitas vezes poderá ser interrompida pela pouca oferta, devida reserva comprometida de leite humano no BLH, o que acarreta em dependência exclusiva de fórmulas em terapia nutricional enteral

desprovidas de glutamina. Aliado a isso, neonatos pré-termo (PT) e com baixo peso ao nascer (BPN), frequentemente, recebem apenas nutrição parenteral total nas primeiras semanas de vida. Cabe ainda destacar que esses bebês possuem pouca massa muscular e, portanto, seus estoques de glutamina são limitados ^{6,7}.

Uma possibilidade do leite humano liofilizado após o processo de pasteurização seria prolongar a vida útil do leite humano, já que leite humano tem uma vida útil de até seis meses quando congelado, a partir do processo de pasteurização seguindo protocolo Rede de Bancos de Leite Humano (RBLH) ⁹.

No estudo Néia V. et al ¹¹ pesquisou o leite humano em pó obtido por diferentes tecnologias (liofilização e spray drying), demonstrou que os ácidos graxos, triacilgliceróis e citocinas foram conservados após os processamentos e apresenta viabilidade de uso na RBLH, além da possibilidade da extensão da vida útil do leite humano com a utilização deste processo.

Para Pereira ¹⁴, o paciente crítico tem necessidade de nutrientes específicos, a glutamina presente no leite humano, em virtude das inúmeras ações que exerce, é considerada um nutriente imunofármaco e passa a ser classificada como um aminoácido essencial nesta condição clínica. Assim sendo, a sua reposição deve ser garantida, e desta forma é fundamental a sua concentração no leite pasteurizado para a evolução do recém-nascido. No Brasil o processo de pasteurização do leite materno é uma alternativa segura para a conservação do leite humano.

A oferta do leite humano pasteurizado ou da própria mãe é indispensável para estes prematuros devido aos seus benefícios frente a fragilidade desta população. Para Nyqvist KH¹⁵ o uso precoce do leite humano tem efeitos positivos importantes para o desenvolvimento do prematuro e contribui para a redução do tempo de internação.

No ano de 2000 Agostoni C et al ⁸, realizaram um estudo analisando o leite materno em várias fases, exceto no leite materno pasteurizado. Foram avaliadas 16 puérperas com recém-nascidos a termo em aleitamento exclusivo, e análise dos aminoácidos nas três fases do leite materno: no colostro, leite maduro com trinta dias e leite maduro aos três meses. Os aminoácidos foram determinados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Concluindo que houve um aumento significativo na concentração da glutamina, conforme a maturação do leite materno que o conteúdo de AA do leite humano, mostrou que glutamina e ácido glutâmico aumentam nas primeiras 4 a 6 semanas da vida, sendo que a glutamina aumentou aproximadamente

2,5 e 20 vezes, respectivamente, com progressão da lactação representando mais de 50% do total AA aos 3 meses.

Neu J et al ¹⁶, constataram que a glutamina apresenta efeito imunomoduladores que protegem os bebês contra infecções.

Para Anni Larnkjær et al ¹⁷, a glutamina é rica no leite materno, mas varia consideravelmente entre as mães. Segundo Moura EC e Carvalho RN ¹⁸ a variação química do leite humano modifica-se com o tempo, de modo a se adaptar às características fisiológicas e às necessidades nutricionais do bebê.

Martins EC et al ¹⁹, relataram que o método desenvolvido para liofilizar o leite humano tem como objetivo preservar suas características, mesmo em temperatura ambiente, sendo armazenado adequadamente para não sofrer alterações de volume, textura, cor, sabor, aroma, teor de vitaminas, sais minerais, proteínas, teor de lipídios principal fonte calórico-energética, dentre outros parâmetros, permitindo que o tempo de prateleira seja superior a 1 ano e, resistem intactos por muitos anos. Assim como Nascimento ²⁰, demonstrou a eficácia do processo de liofilização na conservação dos aspectos nutricionais do leite humano, nas amostras do colostro e do leite humano pasteurizado.

Neste recente estudo os autores Bomfim VS et al ²¹, analisaram o teor de lipídios totais e o perfil lipídico do Leite Humano na Linha de Base (HMB) e dos Concentrados com Leite Humano + liofilizado (com liofilizado de leite no período imediato (HMCI), em 3 meses (HMC3m) e aos 6 meses (HMC6m) de armazenamento). Concluindo que o leite humano liofilizado fortificado como um concentrado de leite humano, traz benefícios potenciais ao recém-nascido, principalmente por conservar os nutrientes essenciais presentes apenas no leite materno.

Em outro estudo Tavares ²², analisou 30 recém-nascidos pré-termo, com idade gestacional inferior 34 semanas, massa corpórea ao nascimento igual ou inferior 1500 gramas, com objetivo de determinar os aminoácidos em dieta modificada no leite humano em três grupos (G): G1= leite humano do banco pasteurizado com 5% do aditivo FM85; G2= leite humano do banco pasteurizado com aditivo do leite humano evaporado e G3= leite humano do banco de leite pasteurizado com aditivo do leite humano liofilizado. Através da dosagem da glutamina sanguínea dos recém-nascidos nos diferentes grupos, demonstrou que a mesma aumenta conforme o grupo (G): (G1<G2<G3), concluindo que há preservação da concentração da glutamina após os processos específicos de evaporação e liofilização.

Neste atual estudo Jarzynka S et al ²³, avaliaram a eficácia e segurança da nova combinação de métodos selecionada para a preservação do leite humano de doadores em comparação com o tratamento térmico, esta combinação das duas técnicas, processamento em alta pressão e liofilização, apresentou o melhor potencial de preservação do valor nutricional do leite humano e foi avaliada quanto à segurança microbiológica.

Com base nestes relatos, nosso estudo optou por liofilizar o leite humano coletado, sendo que o processo de liofilização permite a manutenção dos nutrientes nas amostras por um grande período de tempo. Demonstrou que a concentração da glutamina, se mantém mesmo após os processos de pasteurização e liofilização, fortalecendo a importância do uso do leite materno para os recém-nascidos críticos e prematuros nas unidades de terapia intensiva UTI. Entretanto entendemos que o domínio do processo de liofilização permite uma conservação autêntica, fiel do leite humano e possibilitará dosagem de vários nutrientes importantes da sua composição para reposição em situação clínica crítica para os recém-nascidos.

O processo de liofilização quer seja do leite humano maduro ou leite humano concentrado, como demonstrado no experimento, não interfere nos nutrientes presentes, permitindo uma conservação autêntica e fiel do LH, possibilitando que o mesmo possa ser reconstituído e servido aos recém-nascidos ou ainda adicionado ao leite da mãe complementando a quantidade necessária quando a mãe não seja capaz de oferecer as quantidades necessárias.

Porém fazem-se necessários mais estudos que melhor definam a composição do leite humano pasteurizado e liofilizado, no que refere oligoelementos nutricionais, a exemplo, da glutamina, que são fundamentais quando a administração da terapia nutricional para os recém-nascidos críticos em UTI, com a possibilidade de ofertar o leite humano pasteurizado e liofilizado avaliando a resposta imunomoduladora.

As limitações de literaturas apresentando metodologias para análise do leite humano, em especial na análise da glutamina após a pasteurização e liofilização, foi um dos dificultadores para nosso estudo, uma outra situação é relativa à dificuldade de se obter as doadoras de leite materno, nas condições e padronizações que o estudo requer. Feitas estas observações os resultados da análise forneceram informações confiáveis na constatação da concentração da glutamina no leite humano cru e pasteurizado, após a liofilização. Como resultado adicional a liofilização que é um processo seguro, simples e

de baixo custo, poderá ser utilizado para viabilizar o armazenamento do leite humano nos bancos de leite, estendendo sobremaneira a validade do leite.

Baseado em nossos dados podemos concluir que a concentração da glutamina no leite maduro não apresentou alteração após os processos de pasteurização e liofilização, mantendo íntegro o aminoácido em estudo proposto.

AGRADECIMENTOS

Em memória A Professora **Dra^a. Nair Honda Kawashita** do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso, pela contribuição e liberação dos equipamentos e sua equipe. Sempre honrou a classe de farmacêuticos, colegas docentes e discentes através do ensino e pesquisa, como sempre falava carinhosamente. “Meus alunos foram a parte mais preciosa da minha vida.”

Ao Professor **Dr. Joao Aprígio de Almeida** pela contribuição em nosso estudo, por toda sua trajetória à frente do Rede de Banco de Leite Brasileira, sendo um dos maiores incentivadores a doação do leite materno para redução da mortalidade infantil de reconhecimento internacional pela OMS.

A Equipe Técnica do Laboratório do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biologia da **Universidade de Brasília UnB**, pela valiosa colaboração para realização da análise do material para este estudo.

Palavras-chave: leite humano, aminoácidos, prematuridade, lactantes pré-termo e mulher lactante.

REFERÊNCIAS

1. Silva SMCS, Mura JDP. Tratado de Alimentação, Nutrição e Dietaterapia. 1ª ed. São Paulo: 2007. Roca, 1168.
2. Tamaz RN. Nutrição, promovendo o crescimento. In _____. Intervenções no cuidado Neuropsicomotor do Prematuro, UTI Neonatal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009b; Cap. 3: 19-41.
3. BRASIL. Agência Nacional de vigilância Sanitária. Banco de leite humano Funcionamento, prevenção e controle de riscos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasília: ANVISA, 2008.
4. Valentine CJ, Morrow G, Reisinger A, Dingess KA, Morrow AL, Rogers LK O estágio de lactação do leite humano pasteurizado doador contribuir para as limitações de nutrientes para bebês Nutrientes. 18 de março de 2017;9(3): 302
5. Snoj Tratnik J, Falnoga I, Mazej D, Kocman D, Fajon V, Jagodic M, Stajniko A, Trdin A, Slejkovec Z, Jeran Z, Osredkar J, Sešek-Briški A, Krsnik M, Kobal AB, Kononenko L, Horvat M. Resultados do primeiro biomonitoramento humano nacional na Eslovênia: oligoelementos em homens e mulheres lactantes, preditores de exposição e valores de referência. Int. J. Hyg Environ. Abril de 2019; 222 (3): 563–582
6. Thureen P, Hay W Jr. Intravenous nutrition and postnatal growth of the micropremie. Clin Perinatol. 2000 Mar;27(1):197-219.
7. Li N, Liboni KC, Fang MZ, et al. Glutamine decreases lipopolysaccharide-induced intestinal inflammation in infant rats. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2004b;v.286, G914-G921.
8. Agostoni C, Carratù B, Boniglia C, Lammardo, A, Riva E, Sanzini E et al. Free glutamine and glutamic acid increase in milk through a three-month lactation period. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2000 Nov;31(5):508-12.
9. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Bancos de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília: ANVISA; 2007. p. 67-85.
10. Savino F, Fissore MF, Liguori SA, Oggero R. Can hormones contained in mothers' milk account for the beneficial effect of breast-feeding on obesity in children? Clin Endocrinol (Oxf). 2009 Dec;71(6):757-65.
11. Néia V, Visentainer JV. Leite Humano em pó: Avaliação de diferentes tecnologias de obtenção em relação aos componentes nutricionais e imunológicos como medida alternativa na rede de bancos de leite humano. Indústria de Laticínios, v. 142, p. 53-55, 2020.
12. Oliveira MM, Aragon CD, Bonfim SV, Trevilato MBT, Alves G, Heck RA, Martinez E F, Carmelo SJ Jr. Desenvolvimento de um concentrado de leite humano com liofilizado de leite humano para alimentar bebês prematuros de muito baixo peso ao nascer: um estudo experimental pré-clínico. PLoS ONE. 20 de fevereiro de 2019; 14 (2): e0210999. doi: 10.1371 / journal.pone.0210999. e Collection 2019.
13. Brasil Ministério da Saúde. Secretária de Atenção Primária à saúde – Departamento de Atenção Básica. Caderneta da Gestante / Ministério de Atenção à saúde. Secretária

Atenção à saúde. Departamento de Atenção Básica. – 4ª Ed. Brasília: Editora do Ministério da saúde, 2016

14. Pereira, G. R. Nutritional care of the extremely premature infant. *Clin Perinatol.* 1995 Mar;22(1):61-75.

15. Nygvist KH. Lack of knowledge persist about early breastfeeding competence in preterm infantis. *J Hum Lact.* 2013;29(3):296-9.

16. Neu J, Roig JC, Meetze WH, Veerman M, Carter C, Millsaps M, Bowling D, Dallas MJ, Sleasman J, Knight T, Auestad N. Enteral glutamine supplementation for very low birth weight infants decreases morbidity. *J Pediatr.* 1997 Nov;131(5):691-9.

17. Anni Larnkjær, Signe Bruun, Dorthe Pedersen, Gitte Zachariassen, Vibeke Barkholt, Carlo Agostoni, Christian Mølgaard, Steffen Husby, and Kim F. Michaelsen. Free Amino

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

19. Martins EC, Leonardi RR, Oliveira CR, Matsumoto FMT. Liofilização como Alternativa para Conservação do Leite Humano. *J Health Sci Inst.* 2011; 29(2) 119-22.

20. Nascimento KS. Avaliação da eficácia do uso da técnica de liofilização no processo de conservação do leite humano. Manaus (AM) 2014.

21. Bomfim SV, Alceu J Jr, Alves GL, Martinez EF, Camelo SJJr. Leite humano enriquecido com liofilizado de leite humano para alimentação de bebês prematuros de muito baixo peso ao nascer: um estudo experimental pré-clínico com foco no perfil de ácidos graxos. *PLoS One* 25 de setembro de 2018; 13 (9): e 0202794. doi: 10.1371 / journal.pone.0202794. e Collection 2018.

22. Tavares LVM. Determinação de aminoácidos em recém-nascidos pré-termo alimentados com dieta modificados de leite humano [tese]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2011.

23. Jarzynka S, Strom K, Barbarska, Pawlikowska E, Minkiewicz-Zochniak A, Roisak E, Oledzka G, Wesolowska A. Combinação de processamento de alta pressão e liofilização como as técnicas mais eficazes na manutenção dos valores biológicos e segurança microbiológica do leite de doador. *Int J Environ Res Saúde Pública.* 22 de fevereiro de 2021; 18 (4): 2147.

ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO

Nome: _____ Leito _____ D.N. ____/____/____

Endereço: _____ nº _____ Ponto de referência: _____

Cidade: _____ Estado: _____ Telefone: _____

Idade: _____ Menor de 15 anos () Maior de 35 anos ()

Alfabetizada: Sim () Não ()

Escolaridade: nenhum () fundamental () médio () superior ()

Estado civil: casada () união estável () solteira () outros ()

Antecedentes pessoais: cardiopata () diabetes hipertensão arterial () infecções urinárias
() outros ()

Gravidez atual: peso anterior: _____ peso atual: _____ altura: _____

Iniciou o pré-natal no: 1º trimestre () 2º trimestre () 3º trimestre ()

Dados obstétricos:

Gestação: _____

Tipo de parto: normal () cesárea () fórceps ()

Idade gestacional: _____ sexo feminino () masculino ()

Data de nascimento: ____/____/____ peso: _____ altura _____

Exames clínicos: completos () incompletos () nenhum ()

Imunizações: esquema completo () incompleto () nenhuma ()

Dieta durante a gestação: normal () alterada ()

Suplementação com sulfato ferroso (SF) e ácido fólico (AF)

SF () sim () não AF () sim () não

Data da coleta do leite materno:

1ª ____/____/____

2ª ____/____/____

Data: ____/____/____

Assinatura: _____