

KELY DE PAULA CORREA

**INFLUÊNCIA DA HOMOGENEIZAÇÃO DE LEITE HUMANO SOBRE
PARÂMETROS NUTRICIONAIS E FISIOLÓGICOS: ANÁLISES *IN VITRO* E *IN*
*VIVO***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Jane Sélia dos Reis Coimbra

Coorientadores: Bruno Ricardo de C. Leite Júnior
Maria do Carmo Gouveia Peluzio

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C824i
2021
Correa, Kely de Paula, 1993-
Influência da homogeneização de leite humano sobre
parâmetros nutricionais e fisiológicos : análise *in vitro* e *in vivo*
/ Kely de Paula Correa. – Viçosa, MG, 2021.
153 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Inclui apêndices.

Orientador: Jane Selia dos Reis Coimbra.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Leite humano - Processamento. 2. Leite homogeneizado.
3. Nutrição. 4. Lipídeos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

CDD 22. ed. 613.269

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB6 2523


KELY DE PAULA CORREA

**INFLUÊNCIA DA HOMOGENEIZAÇÃO DE LEITE HUMANO SOBRE
PARÂMETROS NUTRICIONAIS E FISIOLÓGICOS: ANÁLISES *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

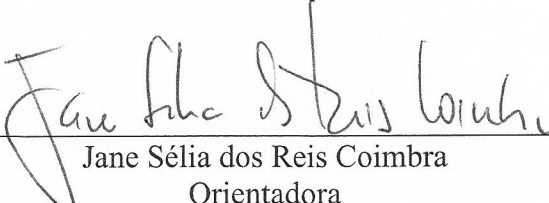
APROVADA: 14 de junho de 2021.

Assentimento:



Kely de Paula Correa

Autora



Jane Sélia dos Reis Coimbra

Orientadora

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao Divino Pai eterno e a Nossa Senhora Aparecida, por todas as bênçãos proporcionadas, saúde e força para alcançar meus objetivos. É esta fé que me dá forças para prosseguir.

Ao meu pai (Geraldo Gomes Correa) e minha mãe (Rosely Constâncio de Paula Correa) por todo amor, carinho, incentivo, orações e por sempre estarem ao meu lado.

À minha orientadora, Professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, agradeço pela orientação, confiança, paciência, amizade e motivação.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) pela oportunidade e condições de realização do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos recursos financeiros concedidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos recursos financeiros concedidos.

Ao Hospital São Sebastião da cidade de Viçosa, em especial aos membros do Banco de Leite Humano.

À professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, por toda atenção, carinho e disponibilidade de recursos.

Ao professor Bruno Ricardo Leite por toda atenção.

À doutora Danielle Aparecida da Silva – FIOCRUZ, pela atenção e oportunidade de deixar mais real nossa experiência com os Bancos de leite humano.

A todos os meus professores, com quem tive oportunidade de aprender durante essa trajetória do doutorado, pelo incentivo, pelas sugestões, correções, esclarecimentos e por todo conhecimento transmitido.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Operações e Processos da UFV.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Estudo de Materiais Alimentares da UFV.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Bioquímica Nutricional da UFV.

As bolsistas de iniciação científica, Sabrina Freitas, Ana Salomão, Sarah Falchetto e Gabriela Lucarelli por toda colaboração, apoio e torcida. Por estarem sempre presentes nos laboratórios com total presteza, foram de imensa ajuda.

Ao Henrique Freitas por todo carinho e companheirismo.

À minha tia Cristina e minha avó Marly por todo apoio e carinho.

À minha amiga, Monique Ellen, pela parceria, por todo companheirismo, por me escutar e por me salvar inúmeras vezes.

As minhas amigas Eliara, Nathane, Kátia, Rafaela, Michele, Michele Campos, Daniele, Ana e Fernanda por todo apoio e companheirismo.

Obrigada a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente durante esses quatro anos de trabalho!

BIOGRAFIA

Kely de Paula Correa, filha de Geraldo Gomes Correa e Rosely Constâncio de Paula Correa, nasceu em Guarani, Minas Gerais, em 04 de junho de 1993.

Em março de 2012 iniciou a graduação em Tecnologia de Laticínios, no Instituto Federal de Sudeste de Minas Gerais- Campus Rio Pomba, concluída em janeiro de 2015.

Em março de 2015 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na UFV, submetendo-se à defesa de sua dissertação em fevereiro de 2017.

Em março de 2017 ingressou no Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na UFV, submetendo-se à defesa de sua tese em junho de 2021.

“Realização é quando fazemos caber o ser que somos na pele de nossas circunstâncias”.

(Padre Fábio de Melo)

RESUMO

CORREA, Kely de Paula, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2021. **Influência da homogeneização de leite humano sobre parâmetros nutricionais e fisiológicos: análises *in vitro* e *in vivo***. Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Coorientadores: Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior e Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

O leite humano possui composição balanceada e é considerado a primeira fonte de nutrição do lactente recém-nascido. Seus componentes incluem anticorpos, enzimas digestivas, micro-organismos benéficos e hormônios. Contudo, estudos comprovam que a composição do leite humano pode passar por variações em função de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os lactentes prematuros internados em unidades de tratamento intensivo neonatal, muitas vezes incapacitados de se alimentar diretamente ao seio materno, contam com o leite humano ordenhado e pasteurizado. Esse leite é oferecido por meio de sondas de alimentação administradas por gavagem ou por bomba, o que leva a perda de alguns nutrientes, principalmente a gordura. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da operação unitária de homogeneização nos constituintes do leite humano no decorrer de seis meses de armazenamento e analisar o efeito nutricional do leite homogeneizado sob o perfil lipídico e ganho calórico *in vivo*. Nesse estudo foi realizada a comparação do custo/ benefício de seis tipos de equipamentos de homogeneização (ultraturrax, processador *mixer*, agitador orbital, homogeneizador de alta pressão, banho ultrassônico e ultrassom de sondas) usados para avaliar a redução da retenção de gordura em sondas de alimentação. Os critérios de desempenho adotados para a avaliação dos homogeneizadores do leite humano para dar continuidade aos estudos foram a formação de glóbulos de gordura com o menor diâmetro médio, a menor percentagem de retenção de gordura nas sondas de alimentação e o menor custo para a implantação. O emprego do processador *mixer* e do ultrassom de sondas forneceram as menores percentagens de retenção de gordura nas sondas de alimentação e não alteraram os perfis das principais proteínas e principais ácidos graxos do leite humano. O processador *mixer* foi o dispositivo selecionado para ser adicionado à linha de processamento de leite humano devido a sua alta eficiência, simplicidade de operação e baixo custo de aquisição e processamento. Com isso, a suplementação da dieta de ratos Wistar foi feita com leite humano homogeneizado no processador *mixer*. De acordo com os resultados, a ingestão da dieta suplementada com leite humano homogeneizado não afetou os parâmetros bioquímicos sanguíneos nem o valor da razão de eficiência alimentar. As análises histológicas do intestino dos animais alimentados

com leite humano homogeneizado e pasteurizado exibiram um fígado saudável e um aumento na profundidade das criptas. A contagem de adipócitos mostrou valores de menor área para o grupo de ratos suplementados com leite humano homogeneizado e pasteurizado quando comparado aos demais grupos. O perfil de ácidos graxos do tecido cerebral animal do grupo suplementado com leite humano homogeneizado mudou após a suplementação com leite humano homogeneizado e pasteurizado, aumentando o conteúdo de ácidos graxos essenciais como o nervônico e docosaenoico no tecido cerebral. A microtomografia do fêmur mostrou tecidos ósseos saudáveis para todos os grupos analisados. Portanto, a etapa de homogeneização na linha de processamento do leite humano pode ser considerada uma abordagem segura e promissora para reduzir a alteração na composição do leite humano após escoamento em sondas de alimentação.

Palavras-chave: Homogeneização. Processamento. Nutrição. Lipídeos.

ABSTRACT

CORREA, Kely de Paula, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, June, 2021. **Influence of human milk homogenization on nutritional and physiological parameters: *in vitro* and *in vivo* analysis.** Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-advisers: Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior and Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Human milk has a balanced composition and is considered the first source of nutrition for newborns. Its components include antibodies, digestive enzymes, beneficial microorganisms and hormones. However, studies have been shown that the composition of human milk can undergo variations due to intrinsic and extrinsic factors. Premature newborns admitted to neonatal intensive care units, often unable to feed directly to the breast, depend on expressed and pasteurized human milk. This milk is offered through feeding tubes administered by gavage or by pump, which leads to a loss of its biological value. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of the homogenization unit operation on the constituents of human milk during six months of storage and to analyze the nutritional effect of the homogenized milk on the lipid profile and caloric gain *in vivo*. In this study, the cost/benefit comparison of six types of homogenization equipment (ultraturrax, mixer processor, orbital shaker, high pressure homogenizer, ultrasonic bath and ultrasound probes) used to study the reduction of fat retention in probes was performed. The performance criteria adopted for the evaluation of homogenizers to continue the human milk studies were the formation of fat globules with the smallest average diameter, the lowest percentage of fat retention in the feeding tubes and the lowest cost for implantation. The use of the mixer processor and ultrasound probes provided the lowest percentages of fat retention in the feeding probes and did not alter the profiles of the main proteins and main fatty acids in human milk. The mixer processor was the device selected to be added to the human milk processing line due to its high efficiency, simplicity of operation and low acquisition and processing cost. Thus, the supplementation of the diet of Wistar rats was made with human milk homogenized in the mixer processor. According to the results, the intake of the diet supplemented with homogenized human milk did not affect the blood biochemical parameters nor the value of the feed efficiency ratio. Histological analyzes of the intestine of animals fed with homogenized pasteurized human milk showed a healthy liver and an increase in the depth of the crypts. The adipocyte count showed lower area values for the group of rats supplemented with homogenized pasteurized human milk when compared to the other groups. The fatty acid profile of animal brain tissue in the group supplemented with homogenized

human milk changed after supplementation with pasteurized homogenized human milk, increasing the content of essential fatty acids such as nervonic and docosahexaenoic in the brain tissue. Femur microtomography showed healthy bone tissue for all analyzed groups. Therefore, the homogenization step in the human milk processing line can be considered a safe and promising approach to reduce the change in the composition of human milk during feeding probes.

Keywords: Homogenization. Processing. Nutrition. Lipids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma do processamento de LH, adaptado do processamento do Banco de leite humano Brasil (2008).....	28
Figura 2: Esquema de execução das técnicas de homogeneização e controle.....	46
Figura 3: Representação da simulação de alimentação por bomba de infusão.	49
Figura 4: Esquema de execução das análises na fase 2.	54
Figure 5: Design of experiments. *Equipment characteristics. **Homogenization time. ***Intensity of homogenization. ****Gavage by gravity and syringe infusion pump. (Infusion pump with a syringe, PERFUSOR compact, B Braun Mcgaw) with 10 mL / H feed flow. UBath (Ultrasonic Bath). HPH (High-Pressure Homogenizer). Mprocessor (Processor mixer). OShaker (Orbital shaker). Uprobe (Ultrasonic Probe). Utrurax (Ultraturax).	72
Figure 6: Simulated gavage feeding (A): By gravity - polypropylene syringe (PS) filled with 10 mL of human milk, 100-cm transparent polyvinyl chloride (PVC) (latex-free) gastric tube (GT). The filled syringe was placed in a holder (H) and positioned approximately 90 cm of distance from the collection tube (CT). After the initial thrust, the syringe emptied by the gravity action. Run time: 10 min. (B): By mechanical device (syringe infusion pump) – polypropylene syringe (PS), transparent extender tube (perfusor) (TP), 100-cm transparent) PVC tube (GT), a syringe (SR); infusion rate: 10.0 mL/h, run time: 1 h.	74
Figure 7: Fat globule size distribution at the condition of greater average size reduction.....	81
Figure 8: Fat retention behavior in feeding tube of syringe infusion pump	83
Figure 9: (A) Fatty acid profile (GC-FID): lower mean diameter and less fat holding for homogenized human milk. (B) Protein analysis (SDS-PAGE): less average diameter and less fat retention homogenized human milk. (C) SDS-PAGE gel of protein.	85
Figura 10: Comparação da porcentagem de retenção de gordura entre os três tratamentos antes e após o escoamento do leite humano pela sonda de alimentação para cada mês. T0 = 0, T1= 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias durante o armazenamento. Tratamentos: (P.Mixer) leite humano ordenhado homogeneizado pelo processador mixer e pasteurizado; (U.Sondas) leite humano ordenhado homogeneizado por ultrassom de sondas e pasteurizado; (Controle) leite humano ordenhado pasteurizado.	106
Figura 11: Porcentagem de retenção de gordura durante os seis meses de armazenamento para os três tratamentos (Controle, P.Mixer e U.Sondas). T = tempo, T0 = 0, T1= 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias.....	107
Figura 12: Imagens de microscopia confocal a laser durante 6 meses (T0 = 0, T1= 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias). P.Mixer = leite humano ordenhado homogeneizado pelo processador mixer e pasteurizado; U.Sondas = leite humano ordenhado homogeneizado por ultrassom de sondas e pasteurizado; Controle = leite humano ordenhado pasteurizado	109

Figura 13: Representação dos dados obtidos pela técnica de difração a laser para os três métodos estudados durante 6 meses de armazenamento (T0 = 0, T1= 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias). Métodos: (P.Mixer) leite humano ordenhado homogeneizado pelo processador mixer e pasteurizado; (U.Sondas) leite humano ordenhado homogeneizado por ultrassom de sondas e pasteurizado; (Controle) leite humano ordenhado pasteurizado. 110

Figura 14: Estudo do perfil eletroforético de proteínas durante o armazenamento durante seis meses para os três tipos de amostras de LH estudados: (C) leite humano pasteurizado, (M) leite homogeneizado por processador mixer e pasteurizado e (U) leite humano homogeneizado por ultrassom de sondas e pasteurizado. T0 = 0, T1= 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias. 116

Figure 15: Human milk (HM) processing flowchart. Process 1: HM processed according to the Human Milk Bank (HMB). Process 2: HMB processing added of the homogenization step. Process 3: Skimmed human milk processing. 125

Figure 16: (16a) Rat weight gain according to the following weeks. (16b) Average feed consumption per week. (16c) Feed efficiency ratio (FER). Treatments: PHM, pasteurized human milk; PHHM, pasteurized-homogenized human milk; PSHM, pasteurized-skimmed human milk. n = 8 animals/group. Values are expressed as mean ± SD. Bars with the same letters showed no significant difference from the Tukey test (p<0.05). 132

Figure 17: Effect of processed human milk intake on (A1) Liver tissue architecture: (17a) control group, (17b) PHM, (17c) PHHM, (17d) PSHM, (CV) central vein, x20 magnification; (A2) Adipocytes in intra-abdominal adipose tissue: (17e) control group, (17f) PHM, (17g) PHHM, (17h) PSHM, 20x magnification; (A3) Intestine tissue: (17i) control group, (17j) PHM, (17k) PHHM, (17l) PSHM, 10x magnification. (C) Crypts. n = 8 animals/group. Twenty images of each coloration per animal were captured directly from the light microscope (Zeiss®, Primo Star model, Oberkochen, Germany) through a photographic camera (Zeiss®, Aixo ERC5s model, Oberkochen, Germany). 140

Figure 18: Effect of processed human milk intake on the trabecular bone cut: (4a) control group, (4b) PHM, (4c) PHHM, (4d) PSHM. n = 8 animals/group. A hundred images per animal were captured. 142

Figura 19: Simulação de alimentação por sondas com leite humano. (A) Leite humano ordenhado pasteurizado. (B) Leite humano homogeneizado (processador mixer) e pasteurizado. (C) Leite humano homogeneizado (ultrassom de sondas) e pasteurizado. Observação: Na figura A é possível observar a separação de gordura (coalescência) no leite humano. 153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do leite humano (%).	23
Tabela 2: Proteínas presentes no leite humano (%).	25
Tabela 3: Nomenclatura do leite humano.	27
Tabela 4: Estudo de técnicas de processamento do leite humano.	31
Tabela 5: Cálculo do número de repetições amostral.	59
Table 6: Physicochemical parameters of human milk control (pasteurized) and homogenized milk at operating conditions for obtaining the smallest fat droplet	79
Table 7: Data of human milk fat globules	80
Table 8: Implementing cost of homogenization in a human milk bank.	87
Tabela 9: Efeito do armazenamento na concentração de ácidos graxos para os três tratamentos estudados. P.Mixer, leite humano ordenhado homogeneizado pelo processador mixer e pasteurizado; U.Sondas, leite humano ordenhado homogeneizado por ultrassom de sondas e pasteurizado; Controle, leite humano ordenhado pasteurizado.	112
Table 10: Composition (mean \pm SD) and process conditions of human milk (pooled crude; PHM, pasteurized; PHHM, pasteurized-homogenized; PSHM, pasteurized-skimmed) before and after flowing through the probes of the infusion pump prototype.	130
Table 11: Average values of body metrics and relative weight of organs.	133
Table 12: Biochemical profile of plasma of Wistar rats fed with water and human milk by gavage. Diet of rat groups: control, water; PHM, pasteurized human milk; PHHM, homogenized-pasteurized human milk; PSHM, skimmed-pasteurized human milk.	135
Table 13: Fatty acid composition (%) of human milk (PHM, pasteurized; PHHM, pasteurized-homogenized; PSHM, pasteurized-skimmed) after flowing through the probes of the infusion pump prototype.	136
Table 14: Profile of fatty acids (%) present in the brain tissue of the rats. PHMc, pasteurized human milk; PHHMc, pasteurized-homogenized human milk; PSHMc, pasteurized-skimmed human milk	137
Table 15: Statistical analysis of the histological assessments. Area of intra-abdominal adipose tissue and crypts number of intestine of animals fed with pasteurized human milk (PHMc), pasteurized-homogenized human milk (PHHMc), and pasteurized-skimmed human milk (PSHMc).	141
Tabela 16: Relação dos resultados de concentração de gordura (%) obtidos pela análise de Gerber e Crematório.	152

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC – Altura da coluna de creme
ATC – Altura total da coluna
BLH – Banco de leite humano
CT – Collection tube
DTA – Departamento de Tecnologia de Alimentos
LH – Leite Humano
LHO – Leite Humano Ordenhado
LHOC – Leite Humano Ordenhado Cru
LHOP – Leite Humano Ordenhado Pasteurizado
LHOHP – Leite Humano Ordenhado Homogeneizado e Pasteurizado
FAMEs – Fatty acid methyl esters
GC- Gas chromatography
GC-FID – Flame ionization detector
GT – Gastric Tube
H – Holder
HM – Human milk
HMB – Human milk Bank
HPH –High-pressure homogenizer
HPHM – Homogenized pasteurized human milk
HPP – Altas Pressões Hidrostáticas
IH – Intensity of homogenization
LTLT – low-temperature long-time
LHOP – Leite humano ordenhado pasteurizado
Mprocessor – Mixer processor
NICU – Neonatal Intensive Care Unit
OMS – Organização Mundial da Saúde
OShaker – Orbital shaker
PHM – Pasteurized human milk
PHHM – Pasteurized-homogenized human milk;
PSHM – Pasteurized-skimmed human milk
PS – Polypropylene syringe
PVC – Policloreto de vinila

PFR – Percentage of fat retention

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada.

RN – Recém-nascido

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TAG – Triacilgliceróis

TH – Time of homogenization

TC – Teor de creme

Ubath – Ultrasonic bath

UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância

UProbe – Ultrasonic probe

UTIN – Unidades de tratamento intensivo neonatal

Uturrax – Ultraturrax/rotor-stator

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	OBJETIVOS	22
2.1	Geral.....	22
2.2	Específicos	22
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3.1	Aspectos nutricionais do leite humano	23
3.2.	Classificação e seleção do leite humano	26
3.3.	Processamento no Banco de Leite Humano.....	27
3.4.	Efeito do processamento na composição do leite humano	30
3.5	Referências.....	36
4.	PROTOCOLOS USADOS NO ESTUDO DA HOMOGENEIZAÇÃO DE LEITE HUMANO SOBRE PARÂMETROS NUTRICIONAIS E FISIOLÓGICOS DE RATOS WISTAR.....	41
4.1	Introdução	43
4.2	Metodologia.....	45
4.2.1	Tipo de estudo.....	45
4.2.2	Seleção da matéria-prima.....	45
4.2.3	Coleta de dados	45
4.2.4	Instrumentos para coleta de dados	46
4.3	Discussão	63
4.4.	Apoio financeiro	63
4.5	Referências.....	64
5.	INFLUENCE OF HOMOGENIZATION ON THE PHYSICOCHEMICAL QUALITY OF HUMAN MILK AND FAT RETENTION IN GASTRIC TUBES	68
5.1	Background.....	69
5.2	Methods.....	70
5.2.1	Design	70
5.2.2	Setting	73
5.2.3	Sample.....	73
5.2.4	Measurement.....	73
5.2.5	Data collection	75
5.2.6	Data analysis	75
5.3	Results.....	78
5.3.1	Characterization of human milk (HM)	78

5.3.2	Size distribution of milk fat globules by laser diffraction analysis	79
5.3.3	Assessment of fat retention in gastric tubes and evaluation of homogenization influence on the protein and fatty acid profiles	82
5.3.4	Choice of homogenization method on a cost-benefit basis and effects on human milk quality	86
5.4	Discussion	88
5.5	Limitations	90
5.6	Conclusions.....	91
5.7	References.....	92
6.	INFLUÊNCIA DA HOMOGENEIZAÇÃO SOBRE OS CONSTITUINTES DO LEITE HUMANO DURANTE O ARMAZENAMENTO	98
6.1	Introdução	99
6.2	Metodologia.....	100
6.2.1	Fonte da matéria-prima.....	100
6.2.2	Caracterização da matéria-prima	100
6.2.3	Processamento do leite humano.....	101
6.2.4	Simulação da alimentação.....	102
6.2.5	Difração a laser	103
6.2.6	Análise dos glóbulos de gordura por microscopia confocal de varredura à laser	103
6.2.7	Eletroforese SDS-Page.....	103
6.2.8	Determinação de ácidos graxos	104
6.2.9	Planejamento estatístico.....	104
6.3	Resultados e Discussão	104
6.3.1	Caracterização físico-química e microbiológica.....	104
6.3.2	Retenção de gordura nas sondas	105
6.3.3	Microscopia Confocal e Difração a laser.....	108
6.3.4	Perfil lipídico	111
6.3.5	Perfil proteico.....	115
6.4	Conclusão.....	117
6.5	Referências.....	118
7.	HOMOGENIZED AND PASTEURIZED HUMAN MILK: LIPID PROFILE AND EFFECT AS A SUPPLEMENT IN THE ENTERAL DIET OF WISTAR RATS	121
7.1	Introduction.....	122
7.2	Methods.....	123
7.3	Results and discussion	129
7.4	Conclusions.....	143

7.5	References.....	144
8	CONCLUSÕES	151
	APÊNDICE A - Notas.....	152

1. INTRODUÇÃO

O leite humano (LH) é a secreção láctica produzida pela lactante, sendo reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) como a principal fonte de nutrição para um lactente recém-nascido até os 6 meses de idade (Garwolińska et al., 2018). O LH possui composição balanceada, o que auxilia no desenvolvimento cognitivo da criança, no ganho de peso e no sistema imunológico (Ramiro-Cortijo et al., 2020). Além disso, o aleitamento materno colabora para recuperação das lactantes após o parto. Alguns estudos relacionam o aleitamento como um indicativo de redução de depressão pós parto e recuperação do peso (Cacho et al., 2017; Castro et al., 2009).

Dificuldades para o aleitamento são verificadas para grupo de recém-nascidos (RN) prematuros que podem apresentar baixo peso ao nascer, deficiências imunológicas, desnutrição intrauterina e necessidades nutricionais especiais em função do trato gastrointestinal imaturo (Amaral et al., 2017).

Como alternativa para garantir a alimentação segura com LH, os bancos de leite humano (BLH) foram criados na década de 80. O BLH é um serviço especializado, responsável por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno e execução de atividades de coleta da produção láctica da lactante, do seu processamento, controle de qualidade e distribuição (Brasil, 2006). A rede brasileira de bancos de leite humano (rBLH-BR) é responsável pela gestão de 222 BLH e 220 postos de coletas de leite humano, além de apoiar as políticas públicas voltadas para o aleitamento materno e bancos de leite humano e desenvolver pesquisas para o uso clínico do leite humano ordenhado (Fundação Oswaldo Cruz, 2020).

O leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP) possui alto teor de gordura e energia, e pode ser direcionado para prematuros, contribuindo para o aumento do ganho de peso dos lactentes. Além da fração de gordura, o leite humano fornece aminoácidos essenciais, que por sua vez são usados na síntese de proteínas necessárias para o crescimento e desenvolvimento do sistema imunológico (Zhu & Dingess, 2019). Assim, uma alternativa de alimentação dos prematuros internados em unidades de tratamento intensivo neonatal (UTIN) é o leite humano ordenhado pasteurizado proveniente de BLH (Brasil, 2006).

O leite humano oferecido pelos BLH passa por procedimentos de congelamento, armazenamento, descongelamento e pasteurização. Esses procedimentos são necessários para manter a segurança microbiológica e nutricional do alimento. (Adhisivam et al., 2018; Vázquez-Román et al., 2014; Vieira et al., 2011). A retenção de nutrientes durante a alimentação do lactente, pode chegar a 50% do volume total de leite oferecido, (Leong et al.,

2014; Narayanan et al., 1984). A retenção está associada à aderência de componentes do leite humano nas sondas de alimentação. A gordura do leite, principal fonte energética para os recém-nascidos, é o componente majoritariamente retido (Correa et al., 2021; Narayanan et al., 1984). A adesão da gordura do leite nas sondas da alimentação pode ser ocasionada principalmente por uma homogeneização ineficiente (ou falta de homogeneização) do leite na linha de processamento do leite humano (Abranches et al., 2014; Correa, 2017; Leong et al., 2014; Narayanan et al., 1984).

Assim, o objetivo desse trabalho foi fazer uma avaliação *in vitro* da influência da operação unitária de homogeneização nos constituintes do LH no decorrer de seis meses de armazenamento, bem como analisar o efeito nutricional *in vivo* do leite homogeneizado inserido na dieta de ratos Wistar.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a influência da operação unitária de homogeneização nos constituintes do leite humano no decorrer de seis meses de armazenamento e analisar o efeito nutricional do leite homogeneizado sob o perfil lipídico e ganho calórico *in vivo*.

2.2 Específicos

- Caracterizar o leite humano ordenhado quanto à sua composição centesimal de proteínas, lipídios, açúcares totais e resíduo mineral fixo.
- Comparar o custo/ benefício de seis tipos de equipamentos de homogeneização (ultraturrax, processador *mixer*, agitador orbital, homogeneizador de alta pressão, banho ultrassônico e sonda de ultrassom) na redução da retenção de gordura em tubos gástricos.
- Avaliar a influência dos diferentes processos de homogeneização na composição de ácidos graxos e no perfil proteico do leite humano.
- Determinar a relação custo / benefício para a inclusão da homogeneização como uma nova etapa no processamento do leite humano.
- Observar alterações na composição e quantidade de ácidos graxos do leite humano durante o armazenamento por 6 meses e no leite humano.
- Determinar o peso e medidas corporais dos animais experimentais: perímetro abdominal, perímetro torácico, comprimento focinho até o ânus.
- Avaliar a influência da ingestão de leite humano homogeneizado no perfil bioquímico do sangue dos animais.
- Caracterizar o perfil lipídico de ácidos graxos de cadeia longa no cérebro dos animais.
- Analisar o efeito nos aspectos morfofuncionais do fígado, intestino e tecido adiposo dos animais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos nutricionais do leite humano

O leite humano possui uma composição diversificada e, dentre os componentes, a água é o majoritário, correspondendo a aproximadamente 90% dos constituintes (Boyce et al., 2016). O leite humano apresenta variações na composição de acordo com a fase de lactação (Tabela 1).

Tabela 1: Composição do leite humano (%).

Espécie		Composição						Referência
		Água	Carboidrato	Lípido	Proteína	Cinzas	EST	
Human a	Col.	88,76	6,55	2,59	1,90	0,2	11,24	(Boyce et al., 2016)
	Mad	89,85	7,18	3,27	1,32	0,24	12,01	(Correa et al., 2021)

Legenda: Col = Colostro. Mad.= Maduro

Para o leite maduro, o teor de lactose está entre 6,7 e 7,8%, a gordura entre 3,2 e 3,6% e a proteína entre 0,9 e 1,3% (Correa et al., 2021). A composição do LH se adequa à necessidade do lactante e fornece nutrientes que são ideais para o seu crescimento e para o seu desenvolvimento (Binte et al., 2021). Em comparação às fórmulas infantis, a composição do LH é variada e completa (Lönnerdal, 2016). Portanto, o estudo dos aspectos nutricionais do LH é necessário.

Perfil lipídico

Os lipídios presentes no leite humano (3 a 5%) são responsáveis pelas principais fontes de energia e contribuem com 44% da energia total fornecida pelo LH (Mosca & Gianni, 2017) ao lactente. Lipídios são os macros nutrientes do LH mais susceptíveis de alterações durante o processamento, apresentam alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água. O leite humano contém mais de 200 ácidos graxos presentes em diferentes concentrações. A composição dos lipídios no LH tem relação direta com a alimentação da lactante. Durante o período de lactação, o teor de lipídios aumenta aproximadamente de 2 g/dL no colostro de 4,9 g/dL no leite maduro (Borgo et al., 2015).

Os triacilgliceróis (TAG), são formados por um glicerol de três carbonos ao qual três ácidos graxos são esterificados. Os TAG correspondem a aproximadamente 98% dos lipídios do leite humano e têm uma estrutura e composição únicas que estão associadas à saúde infantil

(Innis, 2011). Os TAG são sintetizados no retículo endoplasmático rugoso a partir de ácidos graxos retirados da circulação, ou nas células epiteliais mamárias a partir da glicose, e acumulam-se em áreas específicas (Demmelair & Koletzko, 2018). O diâmetro médio dos glóbulos da gordura varia de 0,2 a 15 μm e a sua distribuição de tamanho pode ser alterada sob diferentes condições fisiológicas (Michalski et al., 2004; Yao et al., 2015; Zou et al., 2012). Os glóbulos de gordura do leite materno são maiores durante as 24 h pós-parto, depois reduzem para tamanhos semelhantes aos dos glóbulos nos leites de transição e maduro (Ramiro-Cortijo et al., 2020).

Posto que a constituição do LH é influenciada pelo estado nutricional e a ingestão dietética da lactante, o conteúdo de ácidos graxos essenciais na dieta, como o alfa linolênico (ômega 3) e o ácido linoleico (ômega 6) pode variar também (Yuan et al., 2021). Relata-se que os lipídios do leite de mulheres europeias são constituídos por 35 a 40% de ácidos graxos saturados, 45 a 50% de ácidos graxos monoinsaturados e 15% de ácidos graxos poli-insaturados. Esses ácidos graxos são necessários para o bom desenvolvimento da criança, principalmente dos prematuros que se encontram em uma fase de vulnerabilidade (Agostoni, 2008; Amaral et al., 2017; Carlson, 2009).

Carboidratos

A lactose é o carboidrato presente em maior quantidade no LH. Pode atuar benéficamente no organismo infantil como prebiótico (promove o crescimento de bactérias desejadas no intestino) e na diminuição do risco de infecções (evita a adesão de patógenos na mucosa intestinal) (Cederlund et al., 2013). A concentração de lactose no leite aumenta com a sua maturação, ou seja, com a progressão das fases de lactação humana. O colostro contém cerca de 4% de lactose, o leite de transição em torno de 6,5% e o leite maduro aproximadamente 7,5% (Gibbins *et al.*, 2013; Saint, Smith e Hartmann, 2017).

Proteínas

As proteínas do LH possuem excelentes propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais. A Tabela 2 apresenta a composição proteica do LH e do leite bovino. Observa-se que o LH não contém as proteínas α -caseína e a β -lactoglobulina.

Tabela 2: Proteínas presentes no leite humano (%).

	Leite humano
Proteínas totais	0,89
Caseínas	0,25
α -caseína	0
β -caseína	0,25
κ -caseína	*
Soro proteínas	0,70
α -lactalbumina	0,26
β -lactoglobulina	0
Lactoferrina	0,17
Lisozima	0,05
Albumina	0,05
Imunoglobulinas	0,11
Outras	0,07
Nitrogênio não-proteico	0,25

*: traços. Fonte: Binte *et al.*, (2021), Lönnerdal (2017)

As proteínas do leite são classificadas em três grupos: proteínas da membrana do glóbulo de gordura do leite, caseínas e proteínas do soro de leite. As proteínas da membrana do glóbulo de gordura do leite contribuem com uma pequena porcentagem do conteúdo de proteína do leite humano, cerca de 1%. Essa porcentagem é considerada estável ao longo do tempo. As principais proteínas do soro são a α -lactalbumina, lactoferrina e imunoglobulina A secretora (sIgA) (Lönnerdal, 2017).

As caseínas e as proteínas do soro de leite, quando digeridas pelo recém-nascido liberam peptídeos bioativos e glicanos. Esses compostos são importantes pois possuem atividade moduladora no organismo humano (Lönnerdal et al., 2017). Dentre as proteínas do soro do LH, a lactoferrina é classificada como uma glicoproteína e é encontrada em altas concentrações no leite materno cru. A lactoferrina possui atividade antimicrobiana de amplo espectro, provavelmente devido à sua capacidade de sequestrar ferro ou ao seu efeito lítico nas células microbianas (Pammi & Suresh, 2017).

A lisozima é uma enzima antimicrobiana encontrada no leite humano. Um ponto negativo é a sua termolabilidade que ocasiona a perda de atividade quando sob tratamentos térmicos (Binte et al., 2021). Proteínas com fatores imunológicos compreendem até 10% do conteúdo proteico no LH, onde os anticorpos são os principais componentes (principalmente IgA, IgG e IgM)(Irazusta et al., 2020). Dentre as imunoglobulinas, a IgA é a principal

encontrada no colostro e representa cerca de 90% do total de imunoglobulinas do LH (Lopez and Ménard, 2011).

Minerais

Os minerais do leite humano são classificados em duas classes, sendo a primeira referente aos macromelementos (principais: sódio, potássio, cálcio, magnésio e fósforo) e a segunda referente aos microelementos/elementos traços (principais: cobalto, cobre, iodo, flúor, molibdênio, selênio, cromo, ferro, zinco). Taravati Javad et al. (2018) relataram concentrações médias de Fe, Zn, Cu, Ca, Mg e Na de 0,75, 1,38, 0,35, 255, 34,58 e 155,72 µg/mL, respectivamente. As necessidades diárias do organismo humano de macromelementos são relativamente elevadas, enquanto que de elementos traços, são baixas (Bauer & Gerres, 2011; Morgano et al., 2005).

3.2. Classificação e seleção do leite humano

O leite humano, em função de sua composição variada, é o alimento que satisfaz todas as suas necessidades da espécie humana até seus 6 primeiros meses de vida (Lönnerdal et al., 2017). Destaque-se aqui a expressão “cada mamada é uma vacina” que faz referência à sua constituição nutricionalmente rica (Almeida & Gomes, 1998; Lonnerdal, 1985). A composição do LH é influenciada pelo estado nutricional e ingestão dietética da lactante e varia de acordo com a necessidade do lactente (Mosca & Giannì, 2017). A classificação do LH segundo o BLH é feita com base no período de lactação, acidez Dornic e no índice crematócrito, o qual é usado como parâmetro classificatório do aporte calórico-energético do produto. O LH é também analisado quanto ao conteúdo de coliformes totais a fim de garantir a sua segurança microbiológica (Almeida & Gomes, 1998; Veloso & Almeida, 2009).

A Tabela 3 apresenta a denominação do leite humano, com base na norma BLH- IFF/NT- 23.05 – Seleção e Classificação.

Tabela 3: Nomenclatura do leite humano.

Definições	
Colostro	Primeiro produto da secreção láctica, obtido em média até 7 dias após o parto
Leite Humano de Transição	Secreção láctica da lactante, entre o colostro e o leite maduro, obtido em média entre o 7º e o 15º dia após o parto.
Leite Humano Homólogo	Classificado de acordo com a idade da lactação e idade gestacional na qual ocorreu o parto da doadora, buscando espelhar as características da lactação da mãe do receptor.
Leite Humano Maduro	Secreção láctica da lactante, livre do colostro, obtido em média a partir do 15º dia após o parto.
Leite Humano Ordenhado	Leite humano obtido através do procedimento de ordenha.
Leite Humano Ordenhado Cru	Leite humano ordenhado não submetido a pasteurização

Fonte: Brasil (2006).

Estudos mostram que o colostro tem alta capacidade imunológica, o que reduz a possibilidade da ocorrência de doenças infecciosas, gastrointestinais, diarreias, pneumonias e meningite (Klein et al., 2017; Perrella et al., 2021). A presença desses anticorpos e leucócitos protegem o recém-nascido contra a maioria das bactérias e de alguns vírus. A composição do colostro apresenta ainda influência sobre o desenvolvimento da microflora intestinal, maturidade estrutural e funcional das membranas mucosas.

O risco de alergias e doenças autoimunes são menos frequentes em lactentes amamentadas exclusivamente com LH até o 6 mês de vida (Wu et al. 2015; Mieczan, 2014). No decorrer do período da lactação há aumento das necessidades energéticas das lactantes, em aleitamento materno exclusivo, para garantir a produção do LH e a mobilização de gordura. Recomenda-se uma média adicional a partir dos seis primeiros meses de 400 kcal/dia (Castro et al., 2009).

3.3. Processamento no Banco de Leite Humano

Os bancos de leite humano (BLH) são instituições que coletam, processam e armazenam o leite de lactantes doadoras para alimentação de neonatos, em condições que atendam aos critérios de segurança sanitária e qualidade alimentar do leite. O BLH brasileiro é uma entidade regulamentada pela RDC 171-Anvisa que estabelece os requisitos para a sua instalação e o seu funcionamento e também para a instalação e o funcionamento do Posto de Coleta de Leite Humano, em território nacional (Brasil, 2008).

O fluxograma do processamento do LH pode ser observado na figura 1.

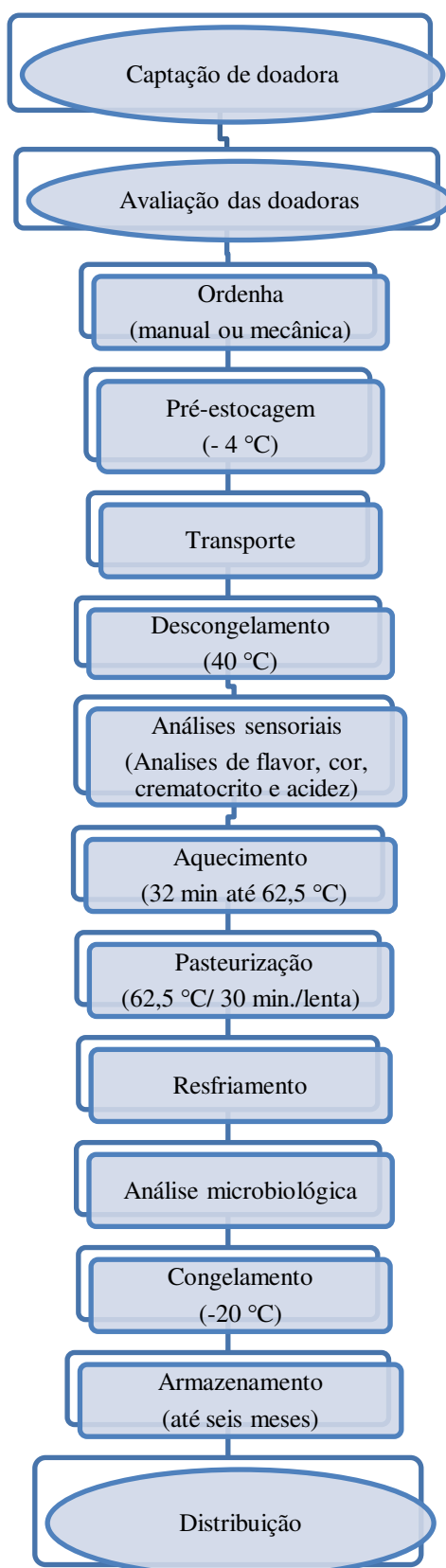


Figura 1: Fluxograma do processamento de LH, adaptado do processamento do Banco de leite humano Brasil (2008).

Muitos RN prematuros de médio e alto risco internados em UTIN não possuem capacidade de se alimentar diretamente ao seio materno devido a sua condição de saúde e baixa capacidade de sucção. Nessa situação, uma alternativa para a alimentação do lactente seria o leite humano ordenhado pasteurizado do BLH pois, o leite humano doado fornece fatores adicionais de proteção e desenvolvimento que não são encontrados nas fórmulas (Binte et al., 2021). Entretanto, o processamento do LH no BLH pode afetar a concentração de seus nutrientes. A gordura é o nutriente que mais varia, com diferenças de até 59% (Czank, Simmer, and Hartmann 2010; Faraghi Ahrabi et al. 2016; Vázquez-Román et al. 2014; Correa, 2017).

Vieira *et al.* (2011) mostraram uma redução significativa das concentrações médias de gordura e proteína após a pasteurização, 5,5 e 3,9%, respectivamente. Os autores observaram que a velocidade de descongelamento do LH não causou variação significativa nas concentrações de macronutrientes. Contudo, verificaram que o transporte do leite por bomba de infusão contínua levou a uma redução na concentração de gordura. As concentrações de gordura e proteína variaram significativamente ($p < 0,05$), com redução de 56,6% e 10,1%, respectivamente. O conteúdo de lactose não sofreu redução significativa em todas as etapas avaliadas.

Ressalta-se que a maior parte do volume de leite humano doado aos BLH ocorre após o 14º dia de lactação e de mães que tiveram seu parto a termo. Assim, o teor de proteína do LH fornecido aos lactentes é quase sempre inferior a 3,25 g / 100 kcal. Portanto, lactentes alimentados com LH doado podem apresentar baixo crescimento (Melo, 2020). Diante dessas variações na composição do leite humano frente ao processamento nos BLH, uma série de técnicas são estudadas, buscando manter a qualidade do leite.

3.4. Efeito do processamento na composição do leite humano

O LH nos BLH é classificado, selecionado, processado e armazenado. Todas as etapas são executadas obedecendo os critérios com rigor, a fim de manter a qualidade nutricional e preservar o alimento de acordo com os parâmetros microbiológicos (Brasil, 2006). A fim de aprimorar as etapas de processamento do BLH várias técnicas vêm sendo estudadas e comparadas, como observado na Tabela 4.

Tabela 4: Estudo de técnicas de processamento do leite humano.

Referências	Objetivo	Tratamento	Número de lactantes	Resultado	Conclusão
Viazis, Farkas e Jaykus, 2008	Investigar a eficácia do tratamento com altas pressões hidrostáticas (HPP) na inativação de patógenos bacterianos	Pasteurização lenta 65 °C/30 min Pressão: 10 a 400 MPa	N = 6	Pasteurização lenta resultou na inativação (> 7 log) de todos os patógenos em 10 min. HPP/30 min: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 reduziu 6 log. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 reduziu 8 log. HPP/30 min: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 reduziu 8 log. HPP/4 min: <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12927 reduziram 8 log. HPP/2 min: <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 reduziu 8 log.	Os dados sugerem que a HPP pode ser uma alternativa promissora para a pasteurização do leite humano.
Permanyer <i>et al.</i> , 2010	Comparar o efeito da pasteurização lenta e 3 tratamentos com HPP na concentração de IgA do leite materno.	Não pasteurizado Pasteurização lenta 65 °C/30 min Pressão: 400, 500 e 600 MPa, Tempo: 5	N = 10	A pasteurização lenta causou perda de IgA em todas as amostras. O tratamento de 400 MPa por 5 min a 12 °C resultou em 100% de preservação de IgA do leite, enquanto após a pasteurização lenta, apenas 72% do IgA foi preservada.	Em termos de retenção de IgA, o HPP proporcionou melhores resultados, gerando um leite humano com capacidade de conferir proteção imunológica ao lactente semelhante ao leite não processado. Quanto à eficácia do HPP para inativar microrganismos, foram obtidos excelentes resultados.
Moltó-Puigmartí <i>et al.</i> , 2011	Comparar o efeito da HPP com a pasteurização lenta	Pasteurização lenta 65 °C/30 min Pressão: 400, 500 e 600 MPa, Tempo: 5 min Arranjo: Fatorial completo	N = 10	A pasteurização lenta levou a reduções na concentração média de vitamina C total e de tocoferóis de 19,9% e 16,2%, respectivamente Não foram detectadas diferenças significativas nas proporções de ácidos graxos entre as amostras tratadas com HPP	O HPP do leite humano, nas condições testadas de temperatura e tempo, não alterou o perfil de ácidos graxos do leite e não altera seu teor de vitamina C e tocoferóis.

García <i>et al.</i> , 2013	Explorar o efeito da pasteurização lenta e do armazenamento a -20 °C (após a pasteurização) na concentração de gordura, nitrogênio total, lactose e conteúdo energético do leite materno	Pasteurização lenta 65 °C/ 30 min com congelamento	N = 28	Redução significativa na gordura (3,5%) conteúdo energético (2,8%) após a pasteurização	A pasteurização lenta diminuiu o conteúdo de gordura e energia do leite humano. O armazenamento na temperatura de -20 °C do leite pasteurizado também reduziu significativamente o teor de gordura, lactose e energia do leite humano.
Christen <i>et al.</i> , 2013	Investigar a diferença na taxa de crescimento bacteriano e na concentração de proteínas leite humano (lactoferrina, lisozima, IgA secretora (sIgA) após ser irradiado por ultravioleta (UV-C), pasteurizado e não tratado.	Não pasteurizado Pasteurização lenta 65 °C/30 min Tratamento ultravioleta: 0, 2084, 3474 e 4863 J/L Pasteurização lenta 65 °C/30 min	N = 10	Taxa de crescimento microbiano foi menor na irradiação UV-C A retenção de sIgA, lactoferrina e lisozima foi de 89%, 87% e 75% para o leite pasteurizado. A retenção de sIgA, lactoferrina e lisozima foi de 49%, 9% e 4 %, respectivamente para o leite irradiado. A dose de radiação UV-C de 85 J/L não afetou as concentrações de lisozima no leite analisado. No leite submetido à pasteurização lenta, a concentração de lisozima diminuiu 47%.	A irradiação UV-C resulta em melhor preservação geral das propriedades bacteriostáticas do leite humano do que a pasteurização lenta. As proteínas sIgA, lisozima e lactoferrina apresentaram maiores concentrações após a irradiação em comparação com a pasteurização lenta.
Martysiak-Żurowska <i>et al.</i> , 2017	Analisar o efeito da irradiação UV-C do leite humano na oxidação lipídica, teor de antioxidantes (vitamina C e catalase, CAT) e compostos bactericidas (lisozima), bem como na capacidade antioxidante total (TAC) do leite materno.	Irradiação UV-C A dose de radiação UV-C fornecida durante 5, 10, 20, 30 e 40 min de exposição foi determinada em 85, 172,9, 355,1, 544 e 740,1 J/L de leite, respectivamente.	N = 5	A exposição do leite humano a UV-C de até 740 J/L exerce efeitos semelhantes nas concentrações de lisozima e vitamina C e no nível de inativação bacteriana aos observados na pasteurização lenta. Ao contrário da pasteurização, a irradiação UV-C não induziu uma diminuição significativa na atividade da catalase	A irradiação UV-C resulta em melhor preservação geral das propriedades bacteriostáticas do leite humano do que a pasteurização lenta
Klotz <i>et al.</i> , 2017	Explorar a eficácia antibacteriana de um tratamento de alta temperatura e curta duração (HTST)	Não pasteurizado	N = 27	Foram encontradas maiores taxas de retenção de fatores enzimáticos e imunologicamente ativos no leite	Um protocolo de tratamento HTST a 62 ° C por cinco segundos foi superior na retenção

	do leite materno humano e seu efeito nas proteínas marcadoras, em comparação com pasteurização lenta.	Pasteurização lenta 65 °C/ 30 min		materno humano após o tratamento com HTST a 62 ° C por cinco segundos em comparação com a pasteurização lenta.	de algumas proteínas marcadoras do leite materno humano em comparação com a pasteurização de lenta padrão. A redução da contagem bacteriana avaliada neste estudo mostra resultados promissores. Os benefícios do F-FH em termos de baixo custo, viabilidade, segurança e retenção de componentes imunológicos o tornam um recurso valioso em países de baixa renda para pasteurizar leite, apesar do aumento da destruição de componentes imunológicos em comparação com a pasteurização lenta.
		62 °C/5 s			
		Não pasteurizado			
Daniels <i>et al.</i> , 2017	Comparar o efeito do método FoneAstra FH (F-FH) com a pasteurização lenta sob os componentes imunológicos do leite humano	Pasteurização lenta 65 °C/ 30 min	N = 50	Pasteurização lenta: Lisozima (15% de retenção), lactoferrina (71,1% de retenção) e IgA (78,9% de retenção). O método F-FH também mostrou uma redução significativa na lactoferrina (38,6 % de retenção) e IgA (apenas 25,2% retida). No entanto, a lisozima foi menos afetada do que os outros dois componentes com 78,4% de retenção.	
		F-FH: 73 °C / segundos			
Adhisivam <i>et al.</i> , 2018	Estudar o efeito da pasteurização lenta sobre os macronutrientes e o perfil de imunoglobulinas do leite humano	Pasteurização lenta 65 °C/ 30 min	N = 20	Macronutrientes: proteína, gordura e energia do leite de humano apresentaram redução em 12,5%, 25% e 16%, respectivamente. No entanto, os carboidratos não foram significativamente reduzidos. Redução da IgA em 30% e a IgG em 60%.	A pasteurização lenta do LH de doador em pool diminui o conteúdo de proteína, gordura e energia e também reduz os níveis de IgA e IgG
Escuder-Vieco <i>et al.</i> , 2018	Comparar os efeitos da pasteurização lenta como tratamento de alta temperatura e curta duração (HTST) sobre alguns compostos bioativos	Pasteurização lenta 65 °C/ 30 min HTST contínuo Temperatura: 70, 72 e 75 °C Tempo: 5 – 25 s Arranjo: fatorial completo	N = 24	A IgG apresentou as maiores taxas de preservação (87 – 10 %) após os tratamentos HTST, seguido por IgA (54 – 88%) e IgM (25 – 73%). Nenhum dos tratamentos térmicos teve um efeito significativo nas concentrações de TGF- β 2, EGF, adiponectina e grelina. A leptina foi detectada em todas as amostras após os diferentes tratamentos HTST.	A qualidade do leite após pasteurização HTST parece melhor do que aquele processado por pasteurização lenta, uma vez que o primeiro permitiu a preservação de concentrações mais elevadas dos compostos bioativos analisados
Wesolowska <i>et al.</i> , 2018	Comparar os efeitos do HPP com a pasteurização lenta	Pasteurização lenta 65 °C/30 min	N = 80		O emprego de HPP levou à preservação de adipocinas, do

		Pressão: 600 MPa, (2) 200 + 400 MPa, (3) 100 + 600 MPa, (4) 200 + 600 MPa		A pasteurização lenta reduziu significativa (49,04%) no conteúdo de IgG. As variantes de HPP 600 MPa, 100 MPa +600 MPa e 200 MPa + 600 MPa também diminuíram estatisticamente de forma significativa o conteúdo de IgG, 69,68, 69,16 e 68,46%, respectivamente.	fator de crescimento, da lactoferrina, e da IgG.
Piemontese <i>et al.</i> , 2019	Investigar o efeito da pasteurização lenta no conteúdo de macronutrientes do Leite humano	Não pasteurizado Pasteurização lenta 65 °C/30 min	N = 39	Macronutrientes: lipídios e proteínas foram os macronutrientes que mais diminuíram após a pasteurização, enquanto a lactose demonstrou uma diminuição marginal	A pasteurização de lenta modifica o teor de macronutrientes do leite humano doado, principalmente reduzindo o teor de lipídios e proteínas.
Pitino <i>et al.</i> , 2019	Comparar o efeito da irradiação, HPP e da pasteurização nas mudanças da composição do LH - macronutrientes, vitamina C, folato e componentes bioativos [lipase estimulada por sais biliares (BSSL), lisozima e lactoferrina]	Pasteurização lenta 65 °C/30 min Irradiação: 250 nm/ 25 min) Pressão: 500 MPa/ 8 min Aquecimento flash - Fervura	N = 32	Macronutrientes: não houve diferença entre os métodos. Vitamina C: Redução de 60 -7 % da atividade para todos os métodos. Lactoferrina apresentou menor redução na concentração após o tratamento com HPP (28%). Os demais métodos apresentaram redução acima de 48%.	HPP parece ser a alternativa mais viável ao método de pasteurização lenta atual devido à sua capacidade superior
Irazusta <i>et al.</i> , 2020	Comparar a HPP em diferentes níveis com a pasteurização convencional do LH sob o efeito na microbiologia e em marcadores imunológicos (IgA, IgG, IgM, sCD14 e TGF-β2)	Pasteurização lenta 65 °C/ 30 min Pressão: 200, 250 e 300 MPa Pressão: 400, 450 e 500 Pa/ 5 min	N = 25	O processamento de HPP entre 400 e 500 MPa a 20 ° C reduziu as contagens de coliformes e bactérias aeróbias totais para níveis indetectáveis (<1,0 log cfu / mL). Alcançou aproximadamente 100% de preservação dos componentes imunológicos.	O HPP a 300 MPa produziu maior inativação dos componentes imunológicos, superiores aos valores obtidos com a pasteurização lenta
Ramírez <i>et al.</i> , 2021	Analisar o efeito do HPP na concentração de imunoglobulinas (IgM, IgA e IgG), no conteúdo de citocinas e na atividade antioxidante do leite humano	Pressão: 200, 400, 600, 800 MPa Temperatura: -15, 0, 10, 30 50 °C Arranjo: Fatorial completo	N = 8	Os tratamentos HPP preservam os componentes imunológicos. A atividade antioxidante do leite não foi afetada pelo processamento do HPP. Os tratamentos a 600 MPa a 0 °C (durante 1 s) foram os mais adequados	O tratamento flash HPP aplicado a 600 MPa e a 0 ° C pode ser a melhor escolha para preservar os parâmetros imunológicos e a atividade antioxidante do leite humano

HPP: Altas Pressões Hidrostáticas.

Diante do exposto, é possível constatar que a composição de leite humano pode ser afetada e variar devido a fatores como idade, fases de lactação, raça, nutrição materna, frequência de administração da dieta para o lactente, técnicas de extração e processamento. Além disso, a perda de nutrientes durante o processamento é outra fonte de variação da sua composição. Por isso, as etapas de processamento devem ser realizadas e aprimoradas com a finalidade de manter os benefícios do leite humano.

3.5 Referências

- Abranches, A. D., Soares, F. V. M., Junior, S.-C. G., Moreira, M. E. L., Abranches, A. D., Soares, F. V. M., G. Junior, S.-C., & Moreira, M. E. L. (2014). Freezing and thawing effects on fat, protein, and lactose levels of human natural milk administered by gavage and continuous infusion. *Jornal de Pediatria*, 90(4), p. 384–388. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2013.11.001>
- Adhisivam, B., Vishnu Bhat, B., Rao, K., Kingsley, S. M., Plakkal, N., & Palanivel, C. (2018). Effect of Holder pasteurization on macronutrients and immunoglobulin profile of pooled donor human milk. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 32(18), p. 3016–3019. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1455089>
- Agostoni, C. (2008). Role of long-chain polyunsaturated fatty acids in the first year of life. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 47 (2), p. S41–S44. <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000338811.52062.b2>
- Almeida, J. A. G. De, & Gomes, R. (1998). Amamentação : Um Híbrido Natureza-Cultura. *Rev.Latino-Am.Enfermagem*, 6(3), 71–76.
- Amaral, Y. N. V., Marano, D., da Silva, L. M. L., Guimarães, A. C. L. D., & Moreira, M. E. L. (2017). Are there changes in the fatty acid profile of breast milk with supplementation of omega-3 sources? A systematic review. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, 39(3), p. 128–141. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1599094>
- Bauer, J., & Gerss, J. (2011). Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clinical Nutrition*, 30(2), p. 215–220. <https://doi.org/10.1016/J.CLNU.2010.08.003>
- Binte, S. Y., Bakar, A., Salim, M., Clulow, A. J., Nicholas, K. R., & Boyd, B. J. (2021). Human milk composition and the effects of pasteurisation on the activity of its components. *Trends in Food Science & Technology*, 111(1), p. 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.055>
- Borgo, L. A., Maria, W., Araújo, C., Conceição, M. H., Resck, I. S., Mendonça, A., & Congelación, P. Y. L. A. (2015). *Original / Otros Are fat acids of human milk impacted by pasteurization and freezing?* 31(3), p. 1386–1393. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8120>
- Boyce, C., Watson, M., Lazidis, G., Reeve, S., Dods, K., Simmer, K., & McLeod, G. (2016). Preterm human milk composition: A systematic literature review. In *British Journal of Nutrition*, 116 (6), p. 1033–1045. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0007114516003007>
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 05 de setembro de 2006. Disponível em:http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0171_04_09_2006.pdf/086680c6-2a27-4629-ba6f-f4f41cef14c3
- Brasil. Ministério da Saúde (2008). Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos. In D. R. de Mello (Ed. 1), Organização do Banco de Leite e do Posto de Coleta. Brasília, DF, 2008. <https://doi.org/Brasília.http://www.redeblh.fiocruz.br/media/blhanv2008.pdf>
- Cacho, N. T., Parker, L. A., & Neu, J. (2017). Necrotizing Enterocolitis and Human Milk Feeding: A Systematic Review. *Clinics in Perinatology*, 44(1), p. 49 – 67. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.009>
- Carlson, S. (2009). Docosahexaenoic acid supplementation in pregnancy and lactation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(2), p. 678–684.

- <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26811E.1>
- Castro, B. M. T., Kac, G., & Sichieri, R. (2009). Determinantes nutricionais e sócio-demográficos da variação de peso no pós-parto: uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, 9(2), p. 125–137.
- Cederlund, A., Kai-Larsen, Y., Printz, G., Yoshio, H., Alvelius, G., Lagercrantz, H., Strömberg, R., Jörnvall, H., Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., Schelonka, R., Infante, A., Yoshio, H., Lagercrantz, H., Gudmundsson, G., Agerberth, B., Palmer, C., Bik, E., DiGiulio, D., ... Long, R. (2013). Lactose in Human Breast Milk an Inducer of Innate Immunity with Implications for a Role in Intestinal Homeostasis. *PLoS ONE*, 8(1), p. e53876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053876>
- Chang, Y., Chen, C., & Lin, M. (2012). *The Macronutrients in Human Milk Change after Storage in Various Containers*. 53 (3), p. 205-9. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2012.04.009>
- Christen, L., Lai, C. T., Hartmann, B., Hartmann, P. E., & Geddes, D. T. (2013). The effect of UV-C pasteurization on bacteriostatic properties and immunological proteins of donor human milk. *PLoS ONE*, 8(12), p. e85867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085867>
- Correa, K. de P. (2017). Estudo de técnicas de homogeneização do leite humano para diminuição da retenção da gordura em sondas nasogástricas. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, p.76. 2017.
- Correa, K. de P., da Silva, M. E. T., Ribeiro, O. A. S., da Matta, S. L. P., Peluzio, M. do C. G., Basílio de Oliveira, E., & Coimbra, J. S. dos R. (2021). Homogenized and pasteurized human milk: lipid profile and effect as a supplement in the enteral diet of Wistar rats. *British Journal of Nutrition*, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0007114521001380>
- Czank, C., Simmer, K., & Hartmann, P. E. (2010). Simultaneous pasteurization and homogenization of human milk by combining heat and ultrasound: effect on milk quality. *The Journal of Dairy Research*, 77(2), p. 183–189. <https://doi.org/10.1017/S0022029909990483>
- Daniels, B., Schmidt, S., King, T., Israel-Ballard, K., Mansen, K. A., & Coutsoudis, A. (2017). The effect of simulated flash-heat pasteurization on immune components of human milk. *Nutrients*, 9(2), p. 178. <https://doi.org/10.3390/nu9020178>
- Demmelair, H., & Koletzko, B. (2018). Lipids in human milk. In *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 32 (1), p. 57 – 68. Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.11.002>
- Escuder-Vieco, D., Espinosa-Martos, I., Rodríguez, J. M., Fernández, L., & Pallás-Alonso, C. R. (2018). Effect of HTST and Holder Pasteurization on the Concentration of Immunoglobulins, Growth Factors, and Hormones in Donor Human Milk. *Frontiers in Immunology*, 9(1), p. 2222. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02222>
- Faraghi Ahrabi, A., Handa, D., Codipilly, C. N., Shah, S., Williams, J. E., McGuire, M. A., Potak, D., Golda Aharon, G., & Schanler, R. J. (2016). Effects of Extended Freezer Storage on the Integrity of Human Milk. *The Journal of Pediatrics*, 177(2), p.140–143. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.06.024>
- Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Rede Global de Bancos de Leite Humano, 2020. Localização dos BLHs e Postos de Coleta. Disponível em: <<https://rbhl.fiocruz.br/localizacao-dos-blhs>>. Acesso em dia 14/06/2021.
- García, L. N. R., Vieco, D. E., De la Cruz-Bértolo, J., Lora-Pablos, D., Velasco, N. U., & Pallás-Alonso, C. R. (2013). Effect of Holder Pasteurization and Frozen Storage on Macronutrients and Energy Content of Breast Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57(3), p. 377–382. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31829d4f82>

- Garwolińska, D., Namieśnik, J., Kot-Wasik, A., & Hewelt-Belka, W. (2018). Chemistry of Human Breast Milk - A Comprehensive Review of the Composition and Role of Milk Metabolites in Child Development. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (45), p. 11881–11896. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04031>
- Gibbins, S., Wong, S. E., Unger, S., & O'Connor, D. (2013). Donor human milk for preterm infants: Practice considerations. *Journal of Neonatal Nursing*, 19(4), p. 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.jnn.2013.04.002>
- Innis, S. M. (2011). Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition. In *Advances in Nutrition* 2 (3), p. 275–283. Oxford Academic. <https://doi.org/10.3945/an.111.000448>
- Irazusta, A., Rodríguez-Camejo, C., Jorcin, S., Puyol, A., Fazio, L., Arias, F., Castro, M., Hernández, A., & López-Pedemonte, T. (2020). High-pressure homogenization and high hydrostatic pressure processing of human milk: Preservation of immunological components for human milk banks. *Journal of Dairy Science*, 103(7), p. 5978–5991. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17569>
- Klein, L. D., Breakey, A. A., Scelza, B., Valeggia, C., Jasienska, G., & Hinde, K. (2017). Concentrations of trace elements in human milk: Comparisons among women in Argentina, Namibia, Poland, and the United States. *PLOS ONE*, 12(8), p. e0183367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183367>
- Klotz, D., Joellenbeck, M., Winkler, K., Kunze, M., Huzly, D., & Hentschel, R. (2017). High-temperature short-time pasteurisation of human breastmilk is efficient in retaining protein and reducing the bacterial count. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 106(5), p. 763–767. <https://doi.org/10.1111/apa.13768>
- Leong, T., Juliano, P., Johansson, L., Mawson, R., McArthur, S. L., & Manasseh, R. (2014). Temperature effects on the ultrasonic separation of fat from natural whole milk. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), p. 2092–2098. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.02.003>
- Lønnerdal, B. (1985). Biochemistry and physiological function of human milk proteins. *Am J Clin Nutr*, 42(6), p. 1299–1317. <http://ajcn.nutrition.org/cgi/content/long/42/6/1299>
- Lønnerdal, B. (2016). Bioactive Proteins in Human Milk: Health, Nutrition, and Implications for Infant Formulas. *Journal of Pediatrics*, 173 (12), p. S4–S9. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.070>
- Lønnerdal, B. (2017). Bioactive Proteins in Human Milk—Potential Benefits for Preterm Infants. In *Clinics in Perinatology*, 44 (1), p. 179–191. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.013>
- Lønnerdal, B., Erdmann, P., Thakkar, S., Sauser, J., & Destailats, F. (2017). Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective | Elsevier Enhanced Reader. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 41(1), p. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.06.001>
- Lopez, C., & Ménard, O. (2011). Human milk fat globules: Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83(1), p. 29–41. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2010.10.039>
- Martysiak-Żurowska, D., Puta, M., Kotarska, J., Cybula, K., Malinowska-Pańczyk, E., & Kołodziejaska, I. (2017). The effect of UV-C irradiation on lipids and selected biologically active compounds in human milk. *International Dairy Journal*, 66(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.009>
- Melo, R. X. (2020). Fatores maternos e perinatais associados à composição nutricional do leite humano de doadoras de banco de leite humano. Dissertação (Mestrado em Pesquisa

- Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da criança e do adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, p.108. 2020.
- Michalski, M. C., Ollivon, M., Briard, V., Leconte, N., & Lopez, C. (2004). Native fat globules of different sizes selected from raw milk: Thermal and structural behavior. *Chemistry and Physics of Lipids*, 132(2), p. 247–261. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.08.007>
- Mieczan, A. W. (2014). Cadmium, lead, copper and zinc in breast milk in Poland. *Biological Trace Element Research*, 157(1), p. 36–44. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9870-x>
- Moltó-Puigmartí, C., Permanyer, M., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2011). Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. *Food Chemistry*, 124 (3), p. 697–702. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.079>
- Morgano, M., Souza, L., Neto, J. M., & Rondó, P. H. C. (2005). Composição mineral do leite materno de bancos de leite. *Ciência e Tecnologia de Campinas*, 25 (1), p. 819–824. <http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n4/27657.pdf>
- Mosca, F., & Gianni, M. L. (2017). Human milk: composition and health benefits. In *La Pediatria medica e chirurgica: Medical and surgical pediatrics*, 39 (2), p. 155. <https://doi.org/10.4081/pmc.2017.155>
- Narayanan, I., Singh, B., & Harvey, D. (1984). Fat loss during feeding of human milk. *Archives of Disease in Childhood*, 59(7), p. 475–477. <https://doi.org/10.1136/adc.59.5.475>
- Pammi, M., & Suresh, G. (2017). Enteral lactoferrin supplementation for prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6 (6).p. 007137. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007137.pub5>
- Permanyer, M., Castellote, C., Ramírez-Santana, C., Audí, C., Pérez-Cano, F. J., Castell, M., López-Sabater, M. C., & Franch, À. (2010). Maintenance of breast milk immunoglobulin A after high-pressure processing. *Journal of Dairy Science*, 93(3), p. 877–883. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2643>
- Perrella, S., Gridneva, Z., Lai, C. T., Stinson, L., George, A., Bilston-John, S., & Geddes, D. (2021). Human milk composition promotes optimal infant growth, development and health. *Seminars in Perinatology*, 45 (6), p.151380. <https://doi.org/10.1016/j.semperi.2020.151380>
- Piemontese, P., Mallardi, D., Liotto, N., Tabasso, C., Menis, C., Perrone, M., Roggero, P., & Mosca, F. (2019). Macronutrient content of pooled donor human milk before and after Holder pasteurization. *BMC Pediatrics*, 19(1), p. 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12887-019-1427-5>
- Pitino, M. A., Unger, S., Doyen, A., Pouliot, Y., Aufreiter, S., Stone, D., Kiss, A., & O'Connor, D. L. (2019). High hydrostatic pressure processing better preserves the nutrient and bioactive compound composition of human donor milk. *Journal of Nutrition*, 149(3), p. 497–504. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy302>
- Ramírez, R., Garrido, M., Rocha-Pimienta, J., García-Parra, J., & Delgado-Adámez, J. (2021). Immunological components and antioxidant activity in human milk processed by different high pressure-thermal treatments at low initial temperature and flash holding times. *Food Chemistry*, 343 (1), p. 128546. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128546>
- Ramiro-Cortijo, D., Singh, P., Liu, Y., Medina-Morales, E., Yakah, W., Freedman, S. D., & Martin, C. R. (2020). Breast milk lipids and fatty acids in regulating neonatal intestinal development and protecting against intestinal injury. *Nutrients*, 12 (2), p. 534.. <https://doi.org/10.3390/nu12020534>
- Saint, L., Smith, M., & Hartmann, P. E. (2017). The yield and nutrient content of colostrum and

- milk of women from giving birth to 1 month post-partum. *British Journal of Nutrition*, 52 (3), p. 87–95. <https://doi.org/10.1079/BJN19840074>
- Vázquez-Román, S., Alonso-Díaz, C., García-Lara, N. R., Escuder-Vieco, D., & Pallás-Alonso, C. R. (2014a). Effect of freezing on the “creamtocrit” measurement of the lipid content of human donor milk. In *Anales de Pediatría (English Edition)*, 81 (3), p.185–188 <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2013.09.004>
- Veloso, L. de F. G., & Almeida, J. A. G. (2009). O aleitamento materno nos programas brasileiros de pós-graduação em Pediatría : perfil das dissertações e teses elaboradas de 1971 a 2006. *Revista Paulista de Pediatría*, 27(2), p. 154–159. <https://doi.org/10.1590/S0103-05822009000200006>
- Viazis, S., Farkas, B. E., & Jaykus, L. A. (2008). Inactivation of Bacterial Pathogens in Human Milk by High-Pressure Processing. In *Journal of Food Protection*, 71 (1), p. 101- 117. http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/71/1/109/1682083/0362-028x-71_1_109.pdf
- Vieira, A. A., Soares, F. V. M., Pimenta, H. P., Abranches, A. D., & Moreira, M. E. L. (2011). Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk’s macronutrient concentrations. *Early Human Development*, 87(8), p. 577–580. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2011.04.016>
- Taravati Javad, M., Vahidinia, A., Samiee, F., Elaridi, J., Leili, M., Faradmal, J., & Rahmani, A. (2018). Analysis of aluminum, minerals and trace elements in the milk samples from lactating mothers in Hamadan, Iran. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, p. 8–15. <https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2018.05.016>
- Wesolowska, A., Sinkiewicz-Darol, E., Barbarska, O., Strom, K., Rutkowska, M., Karzel, K., Rosiak, E., Oledzka, G., Orczyk-Pawilowicz, M., Rzoska, S., & Borszewska-Kornacka, M. K. (2018). New achievements in high-pressure processing to preserve human milk bioactivity. *Frontiers in Pediatrics*, 6 (323), p. 1-10. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00323>
- Wu, J., Domellöf, M., Zivkovic, A. M., Larsson, G., Öhman, A., & Nording, M. L. (2015). NMR-based metabolite profiling of human milk: a pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469 (3), p. 626-632. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.114>
- Yao, Y., Zhao, G., Zou, X., Huang, L., & Wang, X. (2015). Microstructural and lipid composition changes in milk fat globules during milk powder manufacture. *RSC Adv.*, 5(77), p.62638–62646. <https://doi.org/10.1039/C5RA08247A>
- Yuan, T., Wei, W., Zhang, X., Wang, L., Dai, X., Ren, C., Wang, X., & Jin, Q. (2021). Medium- and long-chain triacylglycerols composition in preterm and full-term human milk across different lactation stages. *LWT*, 142 (1), p. 110907. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110907>
- Zhu, J., & Dingess, K. A. (2019). The functional power of the human milk proteome. In *Nutrients*, 11 (8), p. 1834. <https://doi.org/10.3390/nu11081834>
- Zou, X.-Q., Guo, Z., Huang, J.-H., Jin, Q.-Z., Cheong, L.-Z., Wang, X.-G., & Xu, X.-B. (2012). Human milk fat globules from different stages of lactation: a lipid composition analysis and microstructure characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), p. 7158–7167. <https://doi.org/10.1021/jf3013597>

4. PROTOCOLOS USADOS NO ESTUDO DA HOMOGENEIZAÇÃO DE LEITE HUMANO SOBRE PARÂMETROS NUTRICIONAIS E FISIOLÓGICOS DE RATOS WISTAR

Resumo: O leite humano (LH) possui uma rica composição, a qual varia de acordo com diferentes fatores, dentre eles destaca-se a ingestão dietética da lactante e as técnicas de processamento do leite ordenhado. A fração lipídica é o principal componente responsável pelo ganho calórico de recém-nascidos, no entanto durante a etapa de alimentação por sondas ocorre retenção de parte de seu conteúdo nas sondas. Uma alternativa para reduzir esta retenção é a homogeneização do leite humano durante o processamento. A homogeneização reduz o diâmetro médio dos glóbulos de gordura o que possibilita a difusão de proteínas, de caráter tensoativo, para a interface dos novos glóbulos de gordura o que reduz a tensão interfacial do sistema e a coalescência. Assim, neste estudo estão descritos o planejamento e os métodos usados no estudo da influência da homogeneização de leite humano sobre parâmetros nutricionais no decorrer de seis meses de armazenamento e na análise do efeito fisiológico do leite homogeneizado inserido na dieta de ratos *Wistar*. Trata-se de uma pesquisa experimental quantitativa, realizada com amostras de leite humano ordenhado doadas pelo banco de leite humano do hospital São Sebastião, Viçosa- Minas Gerais e coletadas em domicílios. Todas as amostras foram caracterizadas com análises físico-químicas e morfológicas. A pesquisa *in vivo* foi registrada no Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O número de registro do projeto foi 66/2018. O experimento seguiu as diretrizes do Regulamento da União Europeia sobre Cuidados e Uso de Animais em Laboratório. Este estudo trata-se de uma pesquisa cujos achados poderão contribuir para desenvolver uma alternativa de processamento de leite humano ordenhado eficaz para a redução da retenção de gordura em sondas gástricas e melhoria das condições de nutrição de lactentes alimentados exclusivamente com leite humano ordenhado, sobretudo de prematuros internados em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal.

Palavras-chave: Leite humano, homogeneização, protocolo.

Abstract: Human milk (HM) has a rich composition, which varies according to different factors; among them, the dietary intake of the lactating woman and the techniques for processing the expressed milk stand out. The lipid fraction is the main component responsible for the caloric gain of newborns; however, part of its content is retained in the tubes during the feeding by tubes. An alternative to reduce this retention is the homogenization of human milk during processing. Homogenization reduces the average diameter of the fat globules, which allows the diffusion of proteins, with a surface-active character, to the interface of the new fat globules, which reduces the interfacial tension of the system and coalescence. Thus, in this study rats are described the planning and methods used to study the influence of the homogenization of human milk on nutritional parameters during six months of storage and analyze the physiological effect of the homogenized milk inserted in the diet of Wistar rats. This quantitative experimental research was carried out with samples of expressed human milk donated by the human milk bank of the São Sebastião hospital, Viçosa-Minas Gerais, and collected in households. All samples were characterized with physicochemical and morphological analyses. The present research was registered with the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The project registration number was 66/2018. The experiment followed the guidelines of the European Union Regulation on the Care and Use of Animals in the Laboratory. The findings of this study may contribute to developing an effective alternative for the processing of expressed human milk to reduce fat retention in gastric tubes and improve the nutritional conditions of infants fed exclusively with expressed human milk, especially from premature infants admitted to Neonatal Intensive Care Units.

Keywords: Human milk, homogenization, protocol.

4.1 Introdução

O leite humano é recomendado na dieta dos lactentes nas primeiras horas de vida devido a sua rica composição. Dentre seus constituintes, é dado destaque às imunoglobulinas, presentes em grandes quantidades no colostro e que aumentam a defesa imunológica (Martysiak-Żurowska et al., 2017). O leite humano também previne doenças na infância e fornece proteção contra infecções ao estabelecer uma barreira intestinal eficiente (Escuder-Vieco et al., 2018). Contudo, em casos de nascimento prematuro a amamentação é inviabilizada. Esse fato ocorre, uma vez que, o grupo de recém-nascidos (RN) prematuros muitas vezes apresentam baixo peso ao nascer, deficiências imunológicas, desnutrição intrauterina e/ou necessidades nutricionais especiais em função do trato gastrointestinal imaturo (Amaral et al., 2017).

Como alternativa à impossibilidade da amamentação pode ser utilizado o leite humano ordenhado e processado nas etapas de congelamento, armazenamento, descongelamento e pasteurização. Essas etapas são necessárias para manter a segurança microbiológica e nutricional do alimento. (Adhisivam et al., 2018). Outro estágio importante é a distribuição do leite até o lactente, que pode ocorrer por bombeamento. Durante o bombeamento, de acordo com a literatura, o leite humano ao escoar por sondas de alimentação tem uma redução considerável na porcentagem de gordura que pode chegar em até 50% do volume total de leite oferecido (García et al., 2014; Leong et al., 2014; Narayanan et al., 1984). A gordura do leite humano é o principal componente responsável pelo ganho de peso dos lactentes. Além disso, o leite humano é rico no perfil lipídico, sendo composto por ácidos graxos essenciais como ácido araquidônico e o ácido docosaenoico (Meng et al., 2021).

Assim, a fim de reduzir a retenção da gordura do leite humano nas sondas de alimentação, a técnica de homogeneização foi sugerida como uma etapa para processamento do leite humano ordenhado pasteurizado. A homogeneização busca reduzir o diâmetro médio dos glóbulos de gordura e, devido às proteínas presentes no meio que se difundem para a interface dos glóbulos de gordura, o fenômeno da coalescência é reduzido (McClements & Gumus, 2016).

De acordo com esse fato, o presente estudo tem como objetivos descrever o planejamento e os métodos usados no estudo da influência da homogeneização de leite humano sobre parâmetros nutricionais no decorrer de seis meses de armazenamento e na análise do efeito fisiológico do leite homogeneizado inserido na dieta de ratos *Wistar*; caracterizar o perfil lipídico e proteico do leite humano utilizado nesta pesquisa; avaliar a composição de macronutrientes do LH; estudar o efeito da homogeneização na mudança da composição e

verificar o efeito da suplementação com leite humano sobre as medidas corporal, marcadores bioquímicos e perfil lipídico do cérebro de ratos *Wistar*.

4.2 Metodologia

4.2.1 Tipo de estudo

Trata-se de uma pesquisa experimental quantitativa.

4.2.2 Seleção da matéria-prima

As amostras de leite humano utilizadas nesta pesquisa foram obtidas por doação (i) das lactantes após as coletas domiciliares (projeto 2.763.503, aprovado pelo comitê de ética da plataforma Brasil) e (ii) do Banco de Leite Humano do Hospital São Sebastião, Viçosa, MG.

(i): O LH foi coletado pelas próprias lactantes em suas residências, por meio de extração manual. Após cada procedimento, os frascos foram devidamente armazenados em congelador, em domicílio. Posteriormente, as amostras foram buscadas pela equipe e transportadas para o Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e armazenados em *freezer* a -20°C .

(ii): O leite humano doado pelas lactantes ao Banco de Leite do Hospital São Sebastião (Viçosa, MG) foi caracterizado de acordo com os critérios de seleção do BLH. Após a seleção, as amostras que apresentaram presença de pelos foram consideradas inadequadas para processamento. Essas amostras inadequadas foram doadas para os testes. O leite doado foi transportado em caixas isotérmicas (obedecendo à cadeia de frio) para o DTA/UFV. Todo o material estava em frascos de vidro, de acordo com a regulamentação preconizada pela RDC 171/2016.

4.2.3 Coleta de dados

Para a realização deste projeto a coleta de dados foi realizada em três diferentes momentos:

- a) 1ª: Fase: Influência da homogeneização na qualidade físico-química do leite humano e retenção de gordura em sondas gástricas. Nesta fase, as técnicas de homogeneização foram analisadas de acordo com o tempo de operação de cada equipamento, custo, retenção de gordura em sondas de alimentação e efeito no perfil lipídico e proteico do LH.
- b) 2ª: Fase: Influência da homogeneização sobre os constituintes do leite humano durante o armazenamento. Nessa fase foi realizado o estudo da estabilidade do leite humano ordenhado pasteurizado e leite humano ordenhado homogeneizado e pasteurizado durante 6 meses de armazenamento. As amostras de leite humano foram coletadas e

reunidas, formando um *pool*. A partir do *pool* o leite humano foi dividido em 3 diferentes frascos.

- c) 3ª Fase: Estudo do efeito da homogeneização do leite humano sobre o perfil lipídico e ganho calórico de ratos Wistar.

4.2.4 Instrumentos para coleta de dados

4.2.4.1 Fase 1: Influência da homogeneização na qualidade físico-química do leite humano e retenção de gordura em sondas gástricas.

4.2.4.1.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada nessa fase foi obtida do Banco de Leite Humano do Hospital São Sebastião. As amostras coletas estavam congeladas e foram transportadas para o laboratório de Operações e Processos/DTA/UFV. Para execução de todas as análises dessa fase foi utilizado o *pool* (junção do leite humano coletado descartado pelo banco de leite humano). O *pool* formado, totalizando 7,2 L de leite humano, foi filtrado em filtro quantitativo com poro de 45 micrômetros.

4.2.4.1.2 Técnicas de homogeneização

O *pool* filtrado foi aquecido em banho-maria (Tecnal, TE 184, Brasil) até a temperatura de 40 °C. Em seguida, as mostras foram preparadas nas condições descritas na Figura 2.

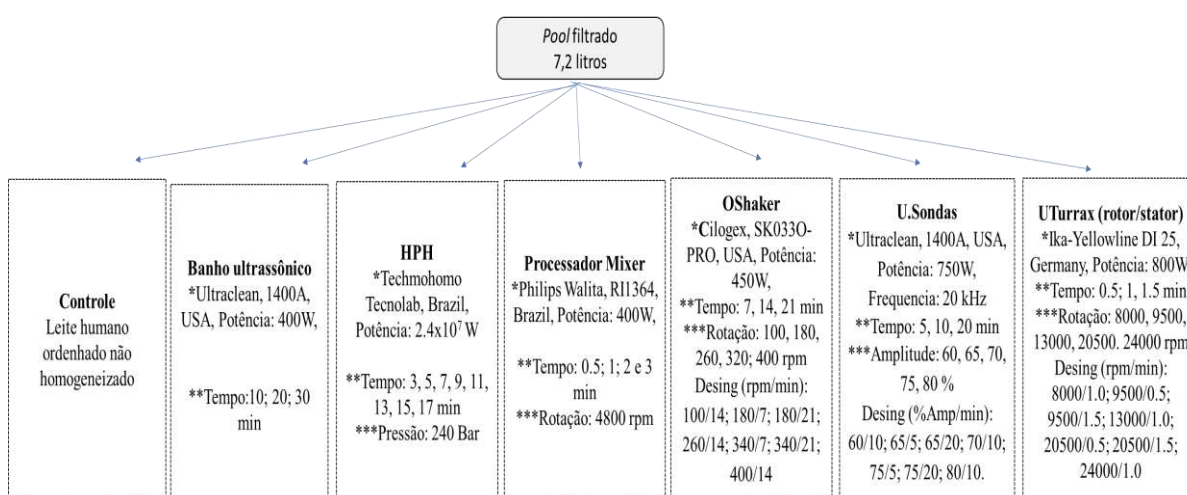


Figura 33: Esquema de execução das técnicas de homogeneização e controle.

* Tipo do equipamento, ** tempo de homogeneização, *** intensidade de operação utilizada na homogeneização para cada equipamento.

4.2.4.1.3 Pasteurização

O leite humano controle e as amostras homogeneizadas foram acondicionadas em diferentes frascos de vidro (7 frascos com o volume de 1020 mL cada). A pasteurização lenta foi conduzida no binômio temperatura/tempo de 65 °C/30 min, como recomendado por BRASIL (2008). A pasteurização foi realizada em frascos de vidro com tampas de plástico aquecidos em banho-maria (Tecnal, TE 184, Brasil). A cada cinco minutos os frascos eram agitados manualmente a fim de manter a uniformização do aquecimento em meio ao fluido. Após obedecer ao tempo da pasteurização os frascos de leite humano foram imersos em banho de gelo com a temperatura de 4 °C.

Após as amostras chegarem na temperatura de 4 °C, O leite humano de cada tratamento foi acondicionado em frascos de vidro de 100 mL com auxílio de provetas e funil de vidros (sanitizados com solução de hipoclorito de sódio na concentração de 200 partes por milhão) e armazenados a -20 °C. Os frascos das amostras foram identificados de acordo com as análises para caracterização físico-química, simulação de alimentação por sondas, difração laser, eletroforese e conteúdo de ácidos graxos.

4.2.4.1.4 Caracterização físico-química

As amostras controle (leite humano ordenhado pasteurizado) e as homogeneizadas (leite humano ordenhado homogeneizado e pasteurizado) foram caracterizadas quanto ao teor de umidade (AOAC 925,09, 2005), cinzas (AOAC 923,03, 2005) e proteínas (AOAC 920,87, 2005). O teor de carboidratos foi obtido por diferença (AOAC, 2005). Também foram realizadas análises de acidez titulável e de potencial hidrogeniônico (pH). A acidez foi determinada por reação estequiométrica do titulante alcalino padrão hidróxido de sódio com os constituintes de caráter ácido presentes no LH. De acordo com as normas de processamento do leite humano, o produto para o consumo é desqualificado quando a acidez é maior ou igual a 8°D (Brasil, 2006).

- Quantificação de lactose

A quantificação de lactose foi realizada por cromatografia de troca iônica. Um grama de cada amostra de leite humano foi pesado (balança analítica, Shimadzu, AY220 Brasil) em um béquer e adicionado de 50 g de água ultrapura (Direct QUV3, Millipore, Itália). O sistema foi mantido sob agitação mecânica (MA085, Tecnal, Brasil) por 1800 s, homogeneizado em banho ultrassônico (UNIQUE, USC-1400A, Brasil) por 300 s, e diluído com água ultrapura

(1:20). Em seguida 10 microlitros das amostras foram injetados no coletor de amostras e analisados por 900 s a 305,15 K. A lactose foi determinada pela técnica de cromatografia troca iônica. O cromatógrafo de íons é equipado com um auto-injetor (Metrohm, 919 IC, Suíça), um detector de pulso amperométrico (Metrohm, 896, Suíça) e o software MagiC Net 2.4. O dissacarídeo foi separado por meio de uma coluna analítica Carb 2 (Metrohm, Carb 2) de 5 µm, 150 x 4,0 mm. O eluente utilizado foi NaOH 0,2 mol/L na vazão de 0,5 mL/s. O dissacarídeo foi identificado e quantificado pela comparação dos tempos de retenção e área dos picos conhecidos dos padrões de α-lactose (Sigma, 99%; USA) previamente injetados (Lin et al., 2018).

- Teor de gordura

O teor de gordura foi avaliado utilizando as técnicas de Crematócrito (Brasil, 2008) e Gerber (Brasil, 2006). O crematócrito é uma técnica analítica que permite o cálculo estimado do conteúdo energético do leite humano ordenhado. No método crematócrito, a gordura (creme) foi separada do leite por meio de uma centrífuga (Inbras, Micro Hematócrito Centrífuga MH 11,5 i, Brasil) de 12.000 g por 15 minutos. Em seguida, a altura da gordura do creme foi aferida com auxílio de uma régua milimetrada e o conteúdo de creme calculado pela Equação 1 (Mizuno et al., 2009):

$$TC = acc * \frac{100}{atc} \quad (1)$$

Em que: TC = teor de creme (%), acc = altura da coluna de creme (mm), atc = altura total da coluna (mm).

A metodologia de quantificação de gordura por Gerber é baseada na digestão da caseína pelo ácido sulfúrico, com exceção da gordura que é separada por centrifugação, auxiliada pelo álcool isoamílico, que modifica a tensão superficial. Adicionou-se a um butirômetro, 10 mL da solução de ácido sulfúrico $d = 1,825$ a 20 °C e transferiu-se 11 mL de amostra de LH homogeneizada, lentamente para o butirômetro evitando sua mistura com o ácido. Acrescentou-se 1 mL de álcool isoamílico. Após vedar o butirômetro com rolha apropriada, o conteúdo foi homogeneizado de modo a promover a mistura completa dos líquidos no interior do aparelho. A mistura foi centrifugada durante cinco minutos de 1000 a 1200 rpm e mantida em banho-maria a 65 °C por cinco minutos para facilitar a visualização da interface. A leitura da

quantidade de gordura presente no leite foi aferida diretamente na escala graduada do butirômetro de acordo com a Norma 68/2006 (Brasil, 2006).

4.2.4.1.5 Simulação da alimentação

A simulação da alimentação por sondas foi feita utilizando um protótipo contendo uma bomba de infusão (B. Braun Meinsungen AG, Germany), um perfusor e uma sonda de 100 cm cloreto de polivinil (Mark Med®, Brazil) (Figura 3).



Figura 34: Representação da simulação de alimentação por bomba de infusão.

A vazão de leite utilizada para avaliar a retenção da gordura nas sondas nasogástricas durante a etapa de alimentação do lactente foi de 10 mL/h. Após a simulação da alimentação, o leite foi acondicionado em frascos de vidro para posterior análises de quantificação de gordura pelo método de Gerber. O teor de gordura foi determinado antes e após o escoamento pelo protótipo.

4.2.4.1.6 Difração a laser

A Difração a laser foi utilizada para caracterizar o diâmetro médio dos glóbulos de gordura e, conseqüentemente, avaliar a eficiência da etapa de homogeneização (Gallier et al., 2015). As distribuições de tamanho dos glóbulos de gordura foram determinadas nas amostras controle (leite humano ordenhado pasteurizado) e nas homogeneizadas (leite humano ordenhado homogeneizado e pasteurizado durante o período de 6 meses (equipamento Mastersizer 2000, Malvern WR14 1XZ, Inglaterra). O volume de 10 mL de leite humano de cada tratamento foi agitado por 2 min. (1500 rpm) em um vórtex (modelo AP 56 – PHOENIX, Brasil); diluído em um tampão de EDTA/NaOH (35 mM, pH 7) para dissociação das micelas de caseína; filtrado (filtro qualitativo Whatman TM n° 1); diluído em um volume de 700 mL de água ultrapura (35X) e então transferido para um béquer para análise de difração (Michalski et al., 2006). Os dados foram obtidos pelo software Mastersizer 2000, versão 5.6.

4.2.4.1.7 Análise de custo-benefício

A análise de custo-benefício foi realizada para verificar quais métodos de homogeneização apresentariam maiores potenciais financeiros de implantação. Assim, foi feita uma estimativa preliminar de custo para a introdução da etapa de homogeneização durante o processamento de leite humano para todos os homogeneizadores testados. Os custos foram divididos em custos de aquisição, densidade de energia, energia operacional, processamento, tempo de operação de um técnico e manutenção dos equipamentos.

A densidade de energia (Wh / L) dos equipamentos de homogeneização testados é um parâmetro adequado para comparar a eficiência da homogeneização em diferentes dispositivos. O desempenho da homogeneização é afetado pelo tempo de residência e pela densidade de energia (a potência dissipada por volume de fluido) (McClements & Gumus, 2016).

A densidade de energia (E_v ; Wh / L) foi determinada usando a Equação 2:

$$E_v (Wh/L) = \frac{P \cdot t}{V} \quad (2)$$

onde P é a potência nominal do equipamento (W), V é o volume da amostra (L) e t é o tempo de homogeneização (h).

Os custos de energia de operação (USD) foram calculados com base em 1 h de operação para cada equipamento. Os valores referentes aos custos de energia (kWh), usados de acordo com o preço das distribuidoras locais de energia e convertidos para a taxa de câmbio do dólar americano, foram determinados usando a Equação 3:

$$E_c (USD) = \frac{kW \cdot t \cdot 0.707}{\$} \quad (3)$$

onde E_c é o custo de operação da energia (USD), kW é a potência do equipamento (kW), t é o tempo de processamento (h), $0,707$ é o custo da energia brasileira ($real / kWh$) e $\$$ é a taxa de conversão em dólar ($real / USD$).

A capacidade de processamento (L / h) foi calculada como o produto entre o volume nominal de cada homogeneizador e o número de ciclos de homogeneização em 1 h de operação, de acordo com a Equação 4:

$$P_c (L/h) = N_v \cdot C_n \cdot t \quad (4)$$

onde P_c é o volume processado por hora (L / h), N_v é o volume nominal do equipamento (L), C_n é o número do ciclo de processamento (-) e t é o tempo de homogeneização (h).

Os custos de tempo do técnico (USD) foram calculados com base no custo de 1 h de operação do equipamento e o número de funcionários necessários para operar o equipamento (Equação 5):

$$O_c (USD) = S \cdot N \cdot t \quad (5)$$

Onde O_c é o custo da mão de obra do técnico para operar o equipamento (USD), S é o salário do técnico por hora (USD / h), N é o número de pessoas necessárias para operar o equipamento e t é o tempo de homogeneização (h) Os custos de manutenção do homogeneizador (USD) foram calculados seguindo a metodologia adotada por Liu et al. (2020), considerando 2% do custo de aquisição do equipamento.

4.2.4.1.8 Perfil de ácidos graxos

As amostras de leite humano homogeneizadas pelas técnicas processador *mixer* e ultrassom de sondas, que apresentaram as melhores respostas na análise de custo-benefício, foram caracterizadas de acordo com o perfil lipídico. Na metodologia de extração de lipídios adaptada de Bligh & Dyer (1959), as amostras de leite humano não homogeneizadas e homogeneizadas foram descongeladas até 40 °C em banho termostaticado (Tecnal, TE 184, Brasil). Uma alíquota de 0,5 g do leite humano foi pesada em balança analítica (Shimadzu, AY 220, Japão) e em sequência adicionada de 3 mL de uma mistura de 2:1 metanol: clorofórmio, para a extração dos lipídios. A mistura foi mantida sob agitação manual por 30 min., seguida da adição de 1 mL de clorofórmio e de 1,8 mL de solução salina (0,9 g/mL de NaCl). Após a separação das três fases formadas, a parte inferior (~ 2 mL) foi pipetada e levada à secagem (45 °C) em banho seco (Labnet, D 1200, EUA). Após a secagem, a massa de lipídios presentes nas amostras foi determinada por gravimetria, obtendo-se uma média de 17,5 mg de lipídios. As fases superior e intermediária foram descartadas em frascos apropriados.

Derivatização: A amostra para a caracterização de ácidos graxos foi preparada pelo método de transesterificação direta adaptado da metodologia descrita por Martinez et. al. (2012). Em um frasco de derivatização foram adicionados 10 mg/mL em hexano e 100 microlitros de um padrão de C11 como padrão interno. A mistura foi aquecida, o hexano foi evaporado e foram adicionados à mistura 15 mg de óleo e 1 mL de solução de KOH 1 M em etanol 70%. Os frascos foram mantidos em banho seco por 1 hora para saponificação a uma rotação de 200 rpm em mesa agitadora (Marconi, MA 140/CF) (Martínez et al., 2012). A mistura foi adicionada de 300 µL de HCl 8 M, 2 mL de hexano, 1 mL de solução de NaCl a

0,9% (m/v); foi levada a aparelho de vórtex e posteriormente deixada sob repouso para separação de fases. Pipetou-se 1 mL do sobrenadante para outro frasco que foi lavado com 1 mL de hexano por 5 vezes e depois seco em estufa a 65 °C para remoção do hexano. Dois microlitros de H₂SO₄ 2 % (v/v) em metanol foram adicionados à mistura que foi então aquecida em banho seco a 90 °C por 90 minutos, adicionada de 1 mL de solução de NaCl 0,9% (m/v) e de 2 mL de hexano. Coletou-se 1 mL do sobrenadante que foi transferido para um frasco Eppendorf contendo 0,1 g de sulfato de sódio anidro. A mistura foi agitada em vórtex (Phoenix Lufenco, Brasil) por 1 minuto e centrifugada a 2800g por 15 minutos (Eppendorf, Alemanha). À uma alíquota de 500 microlitros do sobrenadante foram adicionados 500 microlitros de hexano em frasco *vial* apropriado. A mistura foi levada ao Cromatógrafo Gasoso (Shimadzu, GC-2010, Japão), contendo uma coluna capilar nº 112-88A7 de 100 m x 0,25 mm (SP-2560, Sigma Aldrich, EUA), para que fosse realizada a caracterização dos ácidos graxos. Os ácidos graxos foram identificados por meio dos tempos de retenção dos FAMES da amostra comparados aos tempos de retenção da mistura padrão FAME (Supelco, 37 componentes FAMES Mix, Sigma Aldrich, EUA). Três repetições foram realizadas para a análise de cada amostra.

4.2.4.1.9 Análise de eletroforese SDS-Page

A caracterização das proteínas presentes foi realizada nas amostras de leite humano homogeneizado usando processador *mixer* e ultrassom de sondas que foram os equipamentos que levaram a melhor resposta na análise de custo-benefício. A amostra controle também foi caracterizada a fim de fazer a comparação com o perfil de proteínas das amostras de leite humano homogeneizadas.

As proteínas das amostras de leite humano foram extraídas e a análise de eletroforese foi realizada para o fracionamento e a identificação delas. Para tanto foi utilizado o gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) (Goldfarb et al., 1989). As proteínas foram identificadas a partir da massa molecular da amostra e comparadas com o padrão de massa molecular *TrueColor* (Sinapse biotecnologia, Brasil). Por meio dessa técnica, as proteínas presentes nas amostras das diferentes amostras de leite humano foram caracterizadas e o conteúdo delas foi comparado com o controle.

4.2.4.1.10 Análise dos dados

Para avaliar o efeito da homogeneização para os homogeneizadores processador *mixer*, banho ultrassônico e homogeneizador de alta pressão foram realizados experimentos com 3 repetições em cada tempo analisado. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de confiança de 95% (Leong et al., 2014). Para os homogeneizadores agitador orbital, ultraturrax e da sonda ultrassônica o efeito da homogeneização foi avaliado usando a matriz Doehlert com duas variáveis independentes (intensidade de homogeneização e o tempo de homogeneização) (Correa, 2017). A matriz teve 7 pontos para cada técnica e 3 repetições no ponto central, totalizando 9 unidades experimentais por equipamento.

Os dados de aspectos estruturais (distribuição do tamanho dos glóbulos de gordura, d32, área de superfície específica e amplitude), porcentagem de retenção de gordura nas sondas gástricas, custo, perfil proteico e perfil lipídico foram realizados com 3 repetições. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de confiança de 95% (Leong et al., 2014).

4.2.4.2 Fase 2: Influência da homogeneização sobre os constituintes do leite humano durante o armazenamento.

4.2.4.2.1 Matéria-prima

Na execução de todo o estudo foram usados (i) o *pool* do leite humano doado diretamente pelas lactantes e coletado em domicílio e (ii) o *pool* do leite humano descartado que foi doado pelo Banco de Leite Humano do Hospital São Sebastião (Viçosa, Minas Gerais). Todas as amostras estavam congeladas e foram transportadas para o LOP/DTA/UFV.

O *pool* resultante da mistura dos dois tipos de LH doados (7260 mL) foi filtrado em filtro quantitativo com poro de 45 micrômetros.

4.2.4.2.2 Homogeneização e pasteurização

As técnicas de homogeneização foram selecionadas de acordo com critérios estabelecidos por Correa (2017) que foram a formação de glóbulos de gordura com o menor diâmetro médio, a menor porcentagem de retenção de gordura nas sondas de alimentação e o menor custo para a implantação. O *pool* filtrado foi aquecido em banho-maria (Tecnal, TE 184, Brasil) até a temperatura de 40 °C. Em seguida, as mostras foram homogeneizadas nas condições descritas na Figura 4.

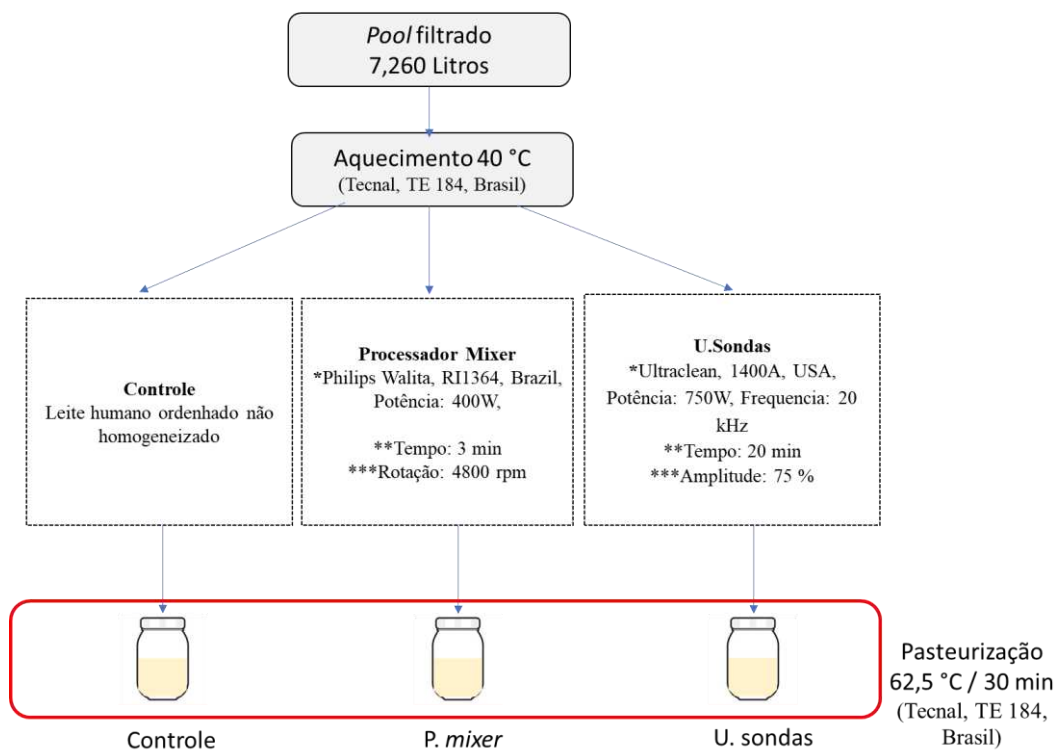


Figura 35: Esquema de execução das análises na fase 2.

* características do equipamento, ** tempo de homogeneização, *** Intensidade de operação utilizada na homogeneização para cada equipamento

Após homogeneização, as amostras foram acondicionadas em 3 frascos de vidro de vidro e pasteurizadas: controle (leite humano ordenhado pasteurizado), P.Mixer (leite humano ordenhado homogeneizado pelo processador *mixer* e pasteurizado), U.Sondas (leite humano ordenhado homogeneizado pelo ultrassom de sondas e pasteurizado).

A pasteurização lenta foi conduzida no binômio temperatura/tempo de 65 °C/30 min, como recomendado por BRASIL (2008), em frascos de vidro com tampas de plástico aquecidas em banho-maria (Tecnal, TE 184, Brasil). A cada cinco minutos os frascos eram agitados manualmente a fim de manter a uniformização do aquecimento em meio ao fluido. Após atingir o tempo da pasteurização os frascos de leite humano foram imersos em banho de gelo na temperatura de 4 °C.

O leite humano de cada tratamento foi acondicionado em frascos de vidro de 100 mL, sanitizados com solução de hipoclorito de sódio na concentração de 200 partes por milhão, com

auxílio de provetas e funil de vidros e foi armazenado a -20 °C. Os frascos foram identificados de acordo com o tempo a ser analisado:

T0 = 0 dias
T1 = 30 dias
T2 = 60 dias
T3 = 90 dias
T4 = 120 dias
T5 = 150 dias
T6 = 180 dias

Para cada tempo foram identificados frascos para as diferentes análises: de caracterização físico-química, simulação de alimentação por sondas, difração laser, eletroforese e ácidos graxos.

4.2.4.2.3 Caracterização físico-química

As amostras de leite humano ordenhado pasteurizado e de leite humano ordenhado homogeneizado e pasteurizado foram caracterizadas com as análises de proteína, lactose, cinzas e umidade no tempo $t = 0$. As análises de gordura, potencial hidrogeniônico e acidez foram realizadas nos tempos = 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Todas as análises de caracterização seguiram o protocolo descrito em 2.2.4.1.4.

4.2.4.2.4 Simulação da alimentação

A simulação da alimentação por sondas foi realizada durante os seis meses de armazenamento (tempos = 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias). Para simular a alimentação dos lactentes foi utilizado um protótipo contendo uma bomba de infusão (B. Braun Meinsungen AG, Germany), perfusor e sonda de 100 cm de cloreto de polivinil (Mark Med®, Brazil). O fluxo utilizado para avaliar a retenção da gordura nas sondas nasogástricas durante a etapa de alimentação do lactente foi de 10 mL/h. Após a simulação da alimentação, o leite foi acondicionado em frascos de vidro para posterior análises. A porcentagem de gordura foi quantificada antes e após o escoamento pelo protótipo a fim de avaliar a retenção de gordura nas sondas.

4.2.4.2.5 Difração a laser

Para a realização das análises de difração a laser as amostras dos três tratamentos, Controle, P. *mixer* e U. sondas, foram descongeladas em banho-maria (Tecnal, TE 184, Brasil) nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias e analisadas conforme a metodologia descrita no item 2.2.4.1.6.

4.2.4.2.6 Microscopia confocal

Para a realização das análises de microscopia confocal as amostras dos três tratamentos, Controle, P. *mixer* e U. sondas, foram descongeladas em banho-maria (Tecnal, TE 184, Brasil) nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias e analisadas.

De cada amostra de leite humano foi retirado uma alíquota de 0,1 mL de leite humano que foi transferida para tubos *Eppendoff* de 2,5 mL. Na sequência foram adicionados 0,01 mL do corante vermelho do Nilo (0,1% m/v em acetona). A solução foi agitada em vórtex por 30 segundos e em seguida uma alíquota de 0,15 mL foi colocada em lâmina de vidro para análise. Os lipídios foram corados com a sonda fluorescente de vermelho e visualizados em microscópio confocal de varredura (LSM 510 META, Alemanha). O emprego dessa técnica permite visualizar diferença entre o diâmetro médio dos glóbulos de gordura. A coloração dos glóbulos de gordura foi realizada segundo Lopez *et al.* (2011).

4.2.4.2.7 Análise de eletroforese SDS-Page

As análises de eletroforese das amostras dos três tratamentos, Controle, P. *mixer* e U. sondas, descongeladas em banho-maria (Tecnal, TE 184, Brasil) foram realizadas nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias e analisadas. A metodologia de caracterização das proteínas de leite humano foi realizada em cada etapa de acompanhamento de acordo com o protocolo descrito em 2.2.4.1.9.

4.2.4.2.8 Perfil de ácidos graxos

As amostras de leite humano ordenhado pasteurizado e leite humano ordenhado homogeneizado e pasteurizado, homogeneizado por processador *mixer* e ultrassom de sondas, foram caracterizadas quanto ao perfil lipídico nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. A metodologia seguida foi descrita no item: 2.2.4.1.7.

4.2.4.2.9 Análise dos dados

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, três replicatas e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o *Statistical Analysis Software* (Versão 9.0, SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA). Para todos os resultados foi considerado o valor de 0.05% de probabilidades pelo teste de Tukey.

4.2.4.3 Fase 3: Estudo do efeito da homogeneização do leite humano sobre o perfil lipídico e ganho calórico em ratos Wistar.

4.2.4.3.1 Matéria-prima

Conforme descrito em 2.2 para execução de todo o estudo foi utilizado o *pool* do leite humano filtrado (papel qualitativo Whatman 1-125mm, 45 μ m) para retirada de sujidades como pêlos e tecido epitelial. O volume de 3 L de leite humano foi fracionado em 3 frações de 1 L. No processamento 1 (leite humano pasteurizado, LHP), o LH foi tratado conforme as normas de processamento do BLH (Brasil, 2008). No processamento 2 (leite humano homogeneizado e pasteurizado, LHHP), o LH foi homogeneizado em processador *mixer* Walita a 4800 rpm/3 min. E no processamento 3 (leite humano desnatado e pasteurizado, LHDP), o LH foi centrifugado, em dois ciclos de 13000g/10 min. Após cada tratamento as amostras foram pasteurizadas 62,5 °C / 30 minutos (Tecnal, TE 184, Brasil) e fracionadas em frascos de vidro.

4.2.4.3.2 Caracterização físico-química

Após cada processamento foram feitas as análises de caracterização do LH, de pH (AOAC 943.71), acidez titulável (AOAC 937.05), resíduo mineral fixo (AOAC 923.03), extrato seco total, proteína (AOAC 920.87), teor de gordura por Gerber (AOAC 989.05) (AOAC, 2005) e coliformes totais (Brasil, 2008). Todas as análises realizadas seguiram o protocolo descrito no item 2.2.4.1.4. A composição centesimal dos diferentes tipos de LH processados foi determinada antes e após o escoamento pelo protótipo usado na simulação da alimentação enteral neonatal.

4.2.4.3.3 Perfil de ácidos graxos do leite humano

A extração de lipídios das amostras foi realizada segundo Ichihara e Fukubayashi (2010). Uma massa de 10 mg de C11 foi diluída em 1 mL de hexano; alíquotas de 100 μ L da

suspensão diluída foram retiradas e adicionadas em tubos de ensaio que foram levados à estufa para secagem. Após a secagem, 10 µL das amostras de leite humano e 60 µL de tolueno foram adicionados a cada tubo de ensaio. As misturas foram agitadas em vórtex, adicionadas de 900 µL de HCl 8% em metanol, de 4,5 mL de metanol, agitadas em vórtex, aquecidas em estufa a 65 °C por 12 h, adicionadas de 1 µL de água deionizada e de 2 mL de hexano. Imediatamente, após a agitação, foi retirada uma alíquota de 1 µL do sobrenadante que foi transferido para um Eppendorf contendo 0,1 g de sulfato de sódio anidro. A amostra foi então centrifugada a 7000 g por 10 min. Para garantir que não ficasse traços de água na amostra, 200 µL da mesma foram diluídos em 800 mL de hexano e reservados para análise cromatográfica. A determinação de ácidos graxos foi realizada pelo método da cromatografia em fase gasosa (equipamento Shimadzu, GC-2010, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) em coluna capilar nº 112-88A7 de 100 m x 0,250 mm x 0,20 µm (SGE HT-5, Supelco); gás de arraste hélio; temperatura de injeção de 270 °C; vazão de purga de 3 mL/min; vazão na coluna de 6,57 mL/min; programação da temperatura de 80 °C por 3 min (inicial), rampa até 330 °C (12 °C/min), 330 °C por 2 min; detector FID (330 °C) de He (30 mL/min), H₂ (40 mL/min) e ar (400 mL/min). As amostras foram derivatizadas com HCl / metanol.

4.2.4.3.4 Considerações éticas

O experimento seguiu as diretrizes do Regulamento da União Européia sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (JO L 358; 18.12.1986), juntamente com a Diretiva 86/609 / EEC, de 24 de novembro de 1986. Todo o procedimento foi realizado em consonância com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2008) e acompanhado por profissional habilitado (Médico Veterinário). O Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA / UFV) da Universidade Federal de Viçosa (MG, Brasil) aprovou o projeto por meio do Processo nº 66/2018.

4.2.4.3.5 Delineamento experimental

Para calcular o número de repetições estimado foi utilizado o método T de Student (Tabela 5), por meio da equação 6:

$$r = 2 * s^2 * (t_{\alpha} + t_{\beta}) * (t_{\alpha} + t_{\beta}) / d^2$$

(6)

em que:

r = número de repetições calculado

s^2 = variância dos dados de referência

t_{α} = probabilidade do erro tipo 1 em função do grau de liberdade do resíduo

t_{β} = probabilidade do erro tipo 2 em função do grau de liberdade do resíduo

d = distância mínima entre médias.

Não foi realizado experimento prévio para cálculo do número de repetições ideal, pois seria necessário a utilização de animais. Desta forma, foram utilizadas informações do estudo de Almeida et al. (2009) sobre a eficácia do consumo alimentar (CEA) de diferentes fontes lipídicas, calculada como a proporção de ganho de peso (g) pelo total de alimento consumido (g).

Tabela 5: Cálculo do número de repetições amostral.

TRT*	GL** do resíduo	T_alfa (5%) bilateral	T_Beta (5%) (unilateral)	s	s ²	d	nº rep sugerido	nº rep calculado
5	14	2,145	1,761	0,01	0,0001	0,0177	3	9,41
5	19	2,093	1,729	0,01	0,0001	0,0177	4	8,82
5	24	2,064	1,711	0,01	0,0001	0,0177	5	8,51
5	29	2,045	1,699	0,01	0,0001	0,0177	6	8,30
5	34	2,048	1,691	0,01	0,0001	0,0177	7	8,26
5	39	2,021	1,684	0,01	0,0001	0,0177	8	8,04
5	44	2,028	1,6888	0,01	0,0001	0,0177	9	8,12
5	49	2,021	1,684	0,01	0,0001	0,0177	10	8,04

*TRT = Tratamentos; **GL = Grau de liberdade

Observa-se que o número de repetições calculado se aproxima do número de repetições sugerido quando este é igual a 8 repetições. Assim, para o experimento proposto, são necessários 32 animais, ou seja, valor correspondente a um total de 8 repetições por tratamento.

Foram utilizados ratos albinos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, recém-desmamados, com 21 dias de idade. Os animais, provenientes do Biotério Central da UFV, foram transportados em caixas de polipropileno sendo onze animais acomodados em cada caixa. As condições ambientais foram controladas com fotoperíodo de 12 h e temperatura média de 23 °C ± 1 °C.

Os animais foram pesados e randomizados de acordo com o peso, distribuídos aleatoriamente e identificados em gaiolas individuais de aço inoxidável. Foram utilizados 32

ratos ($n = 8/\text{grupo}$), randomizados em quatro grupos, com dieta e água *ad libitum*. Os 32 animais foram esquematizados em quatro grupos testes, sendo que um grupo de animais recebeu água (controle), outro grupo leite pasteurizado, outro leite homogeneizado e pasteurizado e outro leite desnatado e pasteurizado. O leite a ser avaliado foi ofertado diariamente a todos os ratos por gavagem.

O peso corporal dos animais foi registrado antes da administração da primeira dose (Dia 1) e duas vezes por semana até o término do estudo. O consumo de alimentação foi mensurado semanalmente. Estes dados foram utilizados para o cálculo do coeficiente de eficiência alimentar (CEA), que é a relação entre o ganho de peso animal e o consumo da dieta:

$$CEA = \frac{\text{Ganho de peso (g)}}{\text{Consumo de dieta (g)}} \quad (7)$$

As medidas corporais (perímetros abdominal e torácico) foram aferidas ao início e ao final da dieta com auxílio de fita métrica inelástica. A diferença entre os valores iniciais e finais da fase experimental e a razão do perímetro abdominal/perímetro torácico foram calculadas. Por meio destes dados, calculou-se o índice de massa corporal (IMC), equação 8, e o índice de Lee, equação 9.

$$IMC = \frac{\text{massa corporal (g)}}{\text{comprimento focinho-ânus (cm)}^2} \quad (8)$$

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{massa corporal (g)}}}{\text{comprimento focinho-ânus (cm)}} \quad (9)$$

4.2.4.3.6 Simulação da Alimentação

O protótipo de alimentação por sondas foi simulado de acordo com o item 2.2.4.1.5. Diariamente, durante o período de 30 dias de experimentação, o leite humano, obtido após os três processamentos avaliados para obtenção do leite humano pasteurizado/LHP, leite humano homogeneizado e pasteurizado/LHHP e do leite humano desnatado e pasteurizado/LHDP, foi escoado pelas sondas de alimentação na vazão de 10 mL/h. O conteúdo de gordura foi quantificado antes e após o escoamento do leite humano pelo protótipo. Após o escoamento pelas sondas de alimentação o leite foi coletado em tubos de ensaio e direcionados para a suplementação da dieta dos ratos Wistar.

O volume semanal de leite humano ofertado por gavagem foi adequado ao ganho de peso dos ratos, pois o volume recomendado é de 1 a 2 mL/100 g de massa corporal (Meier et

al., 2010). Assim, para evitar estresse ou desconforto dos animais, o valor médio de massa corporal do grupo com menor peso médio (semanal) foi usado para calcular o volume semanal de LH a ser administrado. Dessa forma, os volumes de LH ofertados por gavagem foram 0,86 mL (semana 1), 1,3 mL (semana 2), 1,6 mL (semana 3) e 2 mL (semana 4).

4.2.4.3.7 Análises bioquímicas

Ao final do experimento, após jejum de 12 h, os animais foram anestesiados com 100% de isoflurano (Isoforine, Cristália®, Brasil) e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado (tubos 13 × 100 mm; BD Vacutainer®, Brasil) e centrifugado sob refrigeração, a 1006g por 10 min., para a obtenção do soro (Moura e Dias et al., 2018).

O colesterol total, a lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), os triglicerídeos, a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) foram os parâmetros séricos determinadas nas amostras de soro, por meio de método enzimático colorimétrico, utilizando-se os kits comerciais (Bioclin®, Brasil) K083, K071, K117, K049 e K048, respectivamente. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (Mindray Medical International Limited, modelo BS 200, China).

4.2.4.3.8 Perfil de ácidos graxos insaturados do cérebro

Os lipídios extraídos do cérebro dos ratos foram convertidos em ésteres metílicos para obtenção do perfil de ácidos graxos (Ichihara & Fukubayashi, 2010) . As amostras foram diluídas em solução de clorofórmio: metanol (2:1). Os lipídios foram transesterificados com a adição de solução de HCl 8 M em metanol, incubação a 100 °C por 1 h e centrifugação (3000 rpm/10 min). Os ésteres metílicos foram coletados no sobrenadante (fase hexano). Uma alíquota de 1 µL do sobrenadante foi injetada em um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID) (Shimadzu, GC-2010, Japão) e uma coluna capilar nº 112-88A7 de 100 m x 0,25 mm (SP-2560, Sigma-Aldrich, EUA). O gás hélio foi usado como gás de arraste e mantido a uma vazão constante de 363 kPa. Os ésteres metílicos foram separados usando uma rampa de aquecimento linear de 60 a 330 °C, a uma taxa de aquecimento de 20 °C/min e alta velocidade linear para melhor resolução do pico. A identificação do pico foi confirmada por comparação com o mix de ésteres metílicos padrão (SupelCo 37 FAME mix, Sigma-Aldrich, EUA).

4.2.4.3.9 Análises histológicas

Fragmentos do intestino delgado e fígado dos animais foram removidos e fixados, por 24 h, em formalina de Carson, a 25 °C. Após fixação, estes tecidos foram desidratados em gradiente crescente de etanol (70% até álcool absoluto) e incluídos em resina à base de hidroximetilmetacrilato (Historesin, Leica®, EUA). Secções transversais e longitudinais de 3 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (RM2155, Leica®, EUA), com auxílio de navalhas de vidro, e coradas em solução de hematoxilina eosina (HE). Para a análise morfométrica, imagens foram capturadas com objetiva de 10X no microscópio de luz (Primo Star 2012, Zeiss®, Alemanha) por meio de uma câmera de vídeo Aixo ERc5s (Zeiss®, Alemanha). Para o intestino delgado, a altura das vilosidades e largura das vilosidades (região apical, média e basal) e da profundidade das criptas foram medidas com o auxílio do software Image J® versão 4.5 (Media Cybernetics) (Rosa et al., 2016). Aleatoriamente, 10 campos das imagens por animal foram selecionados para a avaliação.

Os fragmentos do tecido adiposo abdominal foram desidratados, incluídos em parafina (Paraplast Plus, Sigma®, Suíça), cortados com 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram montadas com auxílio de Entellan (Merck®, Alemanha). Para a contagem e aferição da área dos adipócitos, 10 campos por animal foram capturados, com a objetiva de 20X, diretamente do microscópio de luz (Primo Star 2012, Zeiss®, Alemanha)(Moura e Dias et al., 2018).

4.2.4.3.10 Análise de microtomografia do fêmur

A quantificação microestrutural foi realizada com uso de microtomógrafo de raio- X de alta resolução SkyScan (modelo 1174v2) e os softwares fornecidos pelo fabricante do scanner NRecon, DataViewer e CT-Analyzer. As imagens foram obtidas com a voltagem de 50 kV, corrente de 670 µA, filtro de alumínio de 0,5 mm, rotação de 360 ° e resolução de 18.11 µm. Foram analisados 50 slices de osso trabecular, localizados 10 slices abaixo da placa de crescimento. O volume trabecular (BV/TV), espessura de trabécula (Tb/Th), número de trabéculas (Tb.N) e espessamento entre trabéculas (Tb.Sp) foram medidos

4.2.4.3.11 Análise dos dados

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para determinar a normalidade dos dados referentes ao teste de ganho de peso, aos testes bioquímicos e à avaliação do perfil lipídico. Após a confirmação da normalidade, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (p<0,05). As análises

estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico SAS (*Statistical Analysis System*, 1999) versão 9.2, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

4.3 Discussão

Neste estudo, diferentes técnicas de homogeneização foram aplicadas ao leite humano ordenhado visando identificar aquela com características adequadas para ser incorporada no processamento do leite humano. Assim, metodologias para análises de custo do equipamento, perfil proteico e lipídico, efeito do armazenamento e efeito na suplementação em dietas de ratos Wistar foram realizadas e avaliadas. A homogeneização foi conduzida com a finalidade diminuir a retenção de gordura nas sondas de alimentação em decorrência da redução do diâmetro médio dos glóbulos de gordura o que retarda a coalescência dos glóbulos. As metodologias de análise foram coerentes com a legislação vigente para processamento de leite humano (Brasil, 2006) e com a AOAC (2019).

As técnicas de análise (*in vitro* e *in vivo*) usadas para estudar do efeito da introdução da etapa de homogeneização no processamento do leite humano avaliaram também a segurança do processamento. O estudo *in vivo*, considerado seguro, indicou que a homogeneização pode ser usada no processamento de leite humano ordenhado destinado a alimentação de lactentes da espécie humana. Espera-se que a técnica analisada contribua para a redução da retenção de gordura nas sondas de alimentação e conseqüentemente mantenha o teor calórico e o perfil lipídico do leite humano. Assim, o uso de leite humano ordenhado homogeneizado e pasteurizado em unidades de tratamento intensivo neonatal poderá contribuir para um maior ganho de peso dos prematuros, além de reduzir a mortalidade e incrementar no desenvolvimento neurológico. Trata-se de uma pesquisa promissora, cujos achados, podem contribuir para melhoria das condições de nutrição dos lactentes.

4.4. Apoio financeiro

Este estudo foi financiado pelo CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; pela Capes, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e pela FAPEMIG, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

4.5 Referências

- Adhisivam, B., Vishnu Bhat, B., Rao, K., Kingsley, S. M., Plakkal, N., & Palanivel, C. (2018). Effect of Holder pasteurization on macronutrients and immunoglobulin profile of pooled donor human milk. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 32(18), p. 3016–3019. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1455089>
- Almeida, Martha Elisa Ferreira Queiroz, J. H., Ribeiro de Queiroz, M. E. L., Brunoro Costa, N. M., & Pinto Matta, S. L. (2009). Tissue lipid profile of rats fed with different lipid sources. *Rev. Nutr*, 22(1), p. 51–60. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732009000100005>
- Amaral, Y. N. V, Marano, D., da Silva, L. M. L., Guimarães, A. C. L. D., & Moreira, M. E. L. (2017). Are there changes in the fatty acid profile of breast milk with supplementation of omega-3 sources? A systematic review. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, 39(3), p. 128–141. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1599094>
- AOAC. (2019). *Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists* (21st ed.). <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos. In D. R. de Mello (Ed. 1), Organização do Banco de Leite e do Posto de Coleta. Brasília, DF, 2008. <https://doi.org/Brasília.http://www.redeblh.fiocruz.br/media/blhanv2008.pdf>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 05 de setembro de 2006
- Correa, K. de P. (2017). Estudo de técnicas de homogeneização do leite humano para diminuição da retenção da gordura em sondas nasogástricas. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, p.76. 2017.
- Escuder-Vieco, D., Espinosa-Martos, I., Rodríguez, J. M., Fernández, L., & Pallás-Alonso, C. R. (2018). Effect of HTST and Holder Pasteurization on the Concentration of Immunoglobulins, Growth Factors, and Hormones in Donor Human Milk. *Frontiers in Immunology*, 9(1), p. 2222. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02222>
- Gallier, S., Vocking, K., Post, J. A., Van De Heijning, B., Acton, D., Van Der Beek, E. M., & Van Baalen, T. (2015). A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136 (2), p. 329–339.

- <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.024>
- García, L. N. R., Escuder-Vieco, D., Alonso Díaz, C., Vázquez Román, S., De la Cruz-Bértolo, J., & Pallás-Alonso, C. R. (2014). Type of Homogenization and Fat Loss during Continuous Infusion of Human Milk. *Journal of Human Lactation : Official Journal of International Lactation Consultant Association*, 30(4), p. 436–441. <https://doi.org/10.1177/0890334414546044>
- Goldfarb, M. F., Savadove, M. S., & Inman, J. A. (1989). Two-dimensional electrophoretic analysis of human milk proteins. *ELECTROPHORESIS*, 10(1), p. 67–70. <https://doi.org/10.1002/elps.1150100117>
- Ichihara, K., & Fukubayashi, Y. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, 51(3), p. 635–640. <https://doi.org/10.1194/jlr.d001065>
- Leong, T., Juliano, P., Johansson, L., Mawson, R., McArthur, S. L., & Manasseh, R. (2014). Temperature effects on the ultrasonic separation of fat from natural whole milk. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), p. 2092–2098. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.02.003>
- Lin, H., Li, S., Xu, C., Pang, M., & Wang, S. (2018). Simultaneous determination of galactose, glucose, lactose and galactooligosaccharides in galactooligosaccharides raw materials by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Food Chemistry*, 263, p. 29–36. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.04.092>
- Liu, C., Zhang, Q., & Wang, H. (2020). Cost-benefit analysis of waste photovoltaic module recycling in China. *Waste Management*, 118, p. 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.08.052>
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N., & Robert, B. (2011). Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry*, 125(2), p. 355–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.005>
- Martínez, B., Miranda, J. M., Franco, C. M., Cepeda, A., & Rodríguez, J. L. (2012). Development of a simple method for the quantitative determination of fatty acids in milk with special emphasis on long-chain fatty acids. *CYTA - Journal of Food*, 10(1), p. 27–35. <https://doi.org/10.1080/19476337.2010.538860>
- Martysiak-Żurowska, D., Puta, M., Kotarska, J., Cybula, K., Malinowska-Pańczyk, E., &

- Kołodziejska, I. (2017). The effect of UV-C irradiation on lipids and selected biologically active compounds in human milk. *International Dairy Journal*, 66, p. 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.009>
- McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, p. 3–26. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.03.002>
- Meier, P. P., Engstrom, J. L., Patel, A. L., Jegier, B. J., & Bruns, N. E. (2010). Improving the use of human milk during and after the NICU stay. In *Clinics in Perinatology*, 37 (1), p. 217–245). <https://doi.org/10.1016/j.clp.2010.01.013>
- Meng, F., Uniacke-Lowe, T., Ryan, C. A., & Kelly, A. L. (2021). The composition and physicochemical properties of human milk: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 112(1), p. 608–621. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.040>
- Michalski, M.-C., Lopez, C., Leconte, N., Briard, V., Soares, A. F., Geloën, A., Michalski, M.-C., Soares, A. F., Lopez, C., Leconte, N., Briard, V., & Geloën, A. (2006). The supramolecular structure of milk fat influences plasma triacylglycerols and fatty acid profile in the rat. *Eur J Nutr European Journal of Nutrition*, 45(4), p. 215–224. <https://doi.org/10.1007/s00394-006-0588-9>
- Mizuno, K., Nishida, Y., Taki, M., Murase, M., Mukai, Y., Itabashi, K., Debari, K., & Iiyama, A. (2009). Is increased fat content of hindmilk due to the size or the number of milk fat globules? *International Breastfeeding Journal*, 4 (7), p. 1-6. <https://doi.org/10.1186/1746-4358-4-7>
- Moura e Dias, M., Pais Siqueira, N., Lopes da Conceição, L., Aparecida dos Reis, S., Xavier Valente, F., Maciel dos Santos Dias, M., de Oliveira Barbosa Rosa, C., Oliveira de Paula, S., da Matta, S. L. P., Licursi de Oliveira, L., Bressan, J., & Gouveia Peluzio, M. do C. (2018). Consumption of virgin coconut oil in Wistar rats increases saturated fatty acids in the liver and adipose tissue, as well as adipose tissue inflammation. *Journal of Functional Foods*, 48, p. 472–480. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.036>
- Narayanan, I., Singh, B., & Harvey, D. (1984). Fat loss during feeding of human milk. *Archives of Disease in Childhood*, 59(5), p. 475–477. <https://doi.org/10.1136/adc.59.5.475>
- Rosa, D. D., Grześkowiak, L. M., Ferreira, C. L. L. F., Fonseca, A. C. M., Reis, S. A., Dias, M. M., Siqueira, N. P., Silva, L. L., Neves, C. A., Oliveira, L. L., MacHado, A. B. F., & Peluzio, M. D. C. G. (2016). Kefir reduces insulin resistance and inflammatory cytokine

expression in an animal model of metabolic syndrome. *Food and Function*, 7(8), p. 3390–3401. <https://doi.org/10.1039/c6fo00339g>

5. INFLUENCE OF HOMOGENIZATION ON THE PHYSICOCHEMICAL QUALITY OF HUMAN MILK AND FAT RETENTION IN GASTRIC TUBES

Artigo publicado no periódico *Journal of Human Lactation* (2021)

DOI: 10.1177/08903344211031456

Abstract: Background: The retention of human milk nutrients in gastric tubes used to feed premature infants is a challenge to overcome.

Research aim/question: The purpose of the present work was to investigate the influence of the homogenization stage in human milk on the loss of nutrients during infant feeding and determining the optimal homogenization technique.

Methods: Six homogenization apparatus (mixing processor, piston valve, ultrasonic bath equipment, ultraturrax, stirrer mixer, and ultrasound probe) were tested and optimized at different levels and times. After homogenization, human milk flowed through the gavage and infusion pump apparatus used to feed the infants. Fat content was quantified before and after feeding. The techniques that reduced the fat globule sizes and/or promoted a lower percentage of fat holding were evaluated for the (i) efficiency in reducing fat retention in gastric tubes; (ii) variations in the fatty acid and protein profiles of human milk; and (iii) energy density and method operation cost.

Results: The use of all evaluated homogenization techniques led to a fat holding reduction in feeding probes. The Mixer processor and the Ultrasound probe equipment reduced fat retention by $99.23 \pm 0.07\%$ and $99.95 \pm 0.02\%$, respectively. Furthermore, they did not negatively influence fatty acid and protein profiles. Finally, the mixer processor showed low energy density and low cost for processing human milk.

Conclusion: Homogenization promoted reducing fat retention in the feed probe; thus, it could help maintain all fat nutrients of human milk during enteral feeding newborns.

5.1 Background

Human milk (HM) has a balanced composition and should be the first natural nutrition source for newborns. Its components include growth factors, antimicrobials, anti-inflammatory agents, digestive enzymes, beneficial microorganisms, and hormones (Adamkin & Radmacher, 2014; Wang et al., 2020).

HM is the nutritional gold standard for infants and especially for premature infants. Macromolecular components, such as lipids and proteins, from human milk are the primary caloric sources of nutrition and weight gain for the newborn, with several advantages over infant formulas and animal milk (Zhang et al., 2020).

Additionally, breastfeeding prevents childhood illnesses, reduces the likelihood of breast cancer development in breastfeeding women, and decreases health costs, among several benefits (Borges et al., 2017). Based on HM composition, studies have shown that breastfeeding decreases the mortality rate of children aged up to five years by approximately 10%, representing an annual reduction of six million deaths worldwide (Borges et al., 2017; Demmelair & Koletzko, 2018).

However, sometimes, not all women can provide milk for their children. It is observed, for instance, that among many factors, breastfeeding becomes difficult, especially if the volume of milk produced by the mother is insufficient to meet the infant's needs, and/or the nursing mother has some infectious disease or requires prolonged hospitalization (Cheng, 2018). In such cases, the Human Milk Bank (HMB) is the main alternative for promoting breastfeeding and performing HM collection, processing, and quality control activities (Ellsworth et al., 2020). The administration of the diet is commonly done with the aid of an infusion pump (which keeps the diet flow controlled) or by gavage (which allows the flow according to the force of gravity) (Dutta et al., 2015).

The network of human milk banks is always seeking to develop and implement innovative technological procedures to increase the quality of processed human milk (Adhisivam et al., 2018). To date, a method implemented in the HMB to ensure the safety of stored milk is the use of pasteurization LTLT (low-temperature long-time; 62.5 °C for 30 min). LTLT processing can reduce the content of bioactive compounds in human milk, such as protein due to denaturation, and immunoglobulin and glutathione due to the action of peroxidase (Guerra et al., 2018). Human milk is also stored at -18 °C since refrigeration changes the total aerobic bacteria count, protein content, and reducing sugar content (Guerra et al., 2018). A challenge in HMB is the fat retention in gastric tubes (Picaud & Buffin, 2017). Thus, efforts are

still needed to define an optimized human milk processing and distribution line (Cheng, 2018) since the steps of processing and administering the diet can result in the loss of nutrients from human milk.

Studies from the 1970s and 1980s first reported a reduction in human milk fat content through an oral feeding device (Brooke & Barley, 1978; Lavine & Clark, 1989). Narayanan et al. (1984) reported that fat retention in gastric tubes could reach up to 40% of the total fat offered to newborns. Several strategies have been tested to reduce this percentage, such as higher infusion flow rates, syringe angulation, milk refrigeration, the use of eccentric nozzle syringes, and the implementation of peristaltic syringe pumps (Picaud & Buffin, 2017).

On the other hand, some results suggest homogenization as an alternative to reduce fat holding in tubes of enteral feeding devices (Davidson & Elabiad, 2019; Picaud & Buffin, 2017). Homogenization uses energy to reduce the size of fat globules. During the homogenization of milk, the energy supplied to the system is used to disrupt the fat globule membranes, promoting the reduction of their size. Then, new fat droplets are formed with a smaller diameter and higher number, leading to an increase in the total interfacial area. Since the amount of phospholipids naturally present in the membranes of fat globules is insufficient to cover the (new) droplets' interfacial area, the proteins present in HM may act as barriers through their net electric charges and bulky size, preventing the coalescence process from happening. Hence, the objectives of this study were (i) to evaluate the performance of six homogenization equipment (ultraturrax, processor mixer, orbital shaker, a high-pressure homogenizer, ultrasonic bath, and ultrasound probe) on the reduction of fat holding in gastric tubes; (ii) to verify the influence of the best homogenization conditions on the fatty acid composition and protein profile of human milk; and (iii) to suggest the inclusion of homogenization as a new step in the milk processing of HMB, taking into consideration the cost/benefit ratio.

5.2 Methods

5.2.1 Design

This study was a cross-sectional study conducted with samples from the Human Milk Bank (HMB) of Hospital São Sebastião, in Viçosa, Brazil. The local HMB receives monthly approximately 30 milk batches of donations containing 300 mL of human milk. The batches containing any physical contaminant (such as hair) are not suitable to be processed by the HMB, and the local HMB kindly provided us with twenty samples of human milk from different

donors. Thus, a volume of 7.2 L of "unsuitable" milk, with appropriate microbiological and physicochemical conditions, was directed to accomplish the present work.

Human milk from different mothers was mixed and divided into 100 mL samples of homogenized pasteurized milk (HPHM; treatments) or pasteurized milk (PHM; control). The effect of homogenization on human milk was studied using six homogenization methods. Figure 5 shows the operating conditions used in each equipment: ultrasonic bath (Ubath) (Ultraclean, 1400A, USA, 400 W, 40 kHz), high-pressure homogenizer (HPH) (Tecnolab, Techmohomo, Brazil, 1500 W), mixer processor (Mprocessor) (Philips Walita, RI1364, Brazil, 400 W), orbital shaker (OShaker) (Cilogex, SK033O-PRO, USA, 450 W), ultrasonic probe (UProbe) (Ultraclean, 1400A, USA, 750 W, 20 kHz), and ultraturrax/rotor-stator (UTurrax) (Ika, Yellowline DI 25, Germany, 800 W).

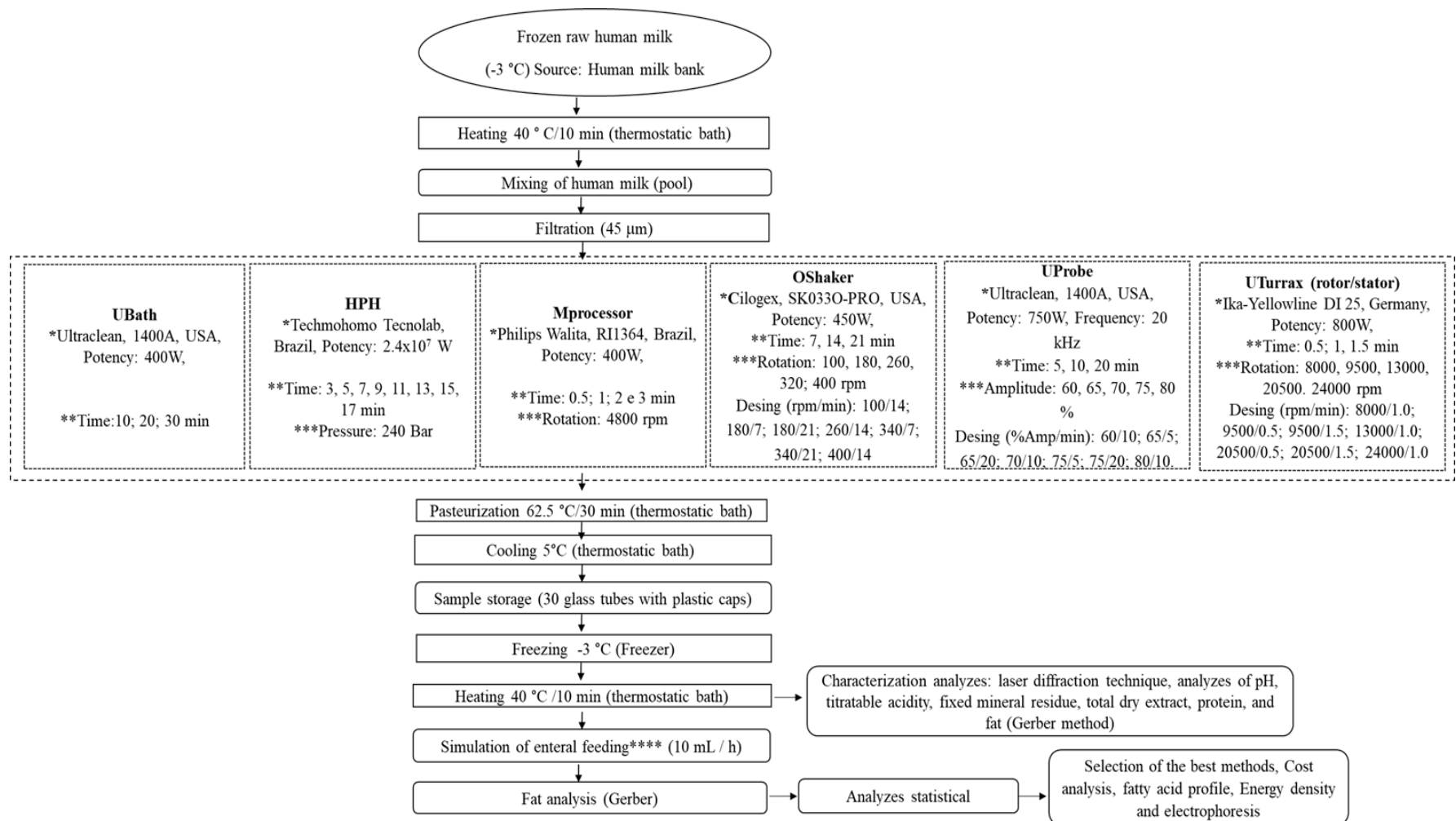


Figure 36: Design of experiments. *Equipment characteristics. **Homogenization time. ***Intensity of homogenization. ****Gavage by gravity and syringe infusion pump. (Infusion pump with a syringe, PERFUSOR compact, B Braun Mcgaw) with 10 mL / H feed flow. UBath (Ultrasonic Bath). HPH (High-Pressure Homogenizer). Mprocessor (Processor mixer). OShaker (Orbital shaker). Uprobe (Ultrasonic Probe). UTurrax (Ultraturrax).

5.2.2 Setting

The Brazilian network of human milk comprises 222 human milk banks, 12 of which are in Minas Gerais Province. The Human Milk Bank at the São Sebastião Hospital in Viçosa city (Minas Gerais) was created in 2005. Since 2011, it has been part of the National Human Milk Bank Network that is organized, regulated (Brasil, 2008), and controlled by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ-RJ).

The human milk bank is essential because it serves mothers who have their babies admitted to the neonatal ICU and/or cannot breastfeed their children. The average monthly human milk collection capacity is approximately 20 L. In addition, the HMB has an average monthly participation of approximately 30 donors. To meet the donor profile, the woman needs to be healthy, with the prenatal exams updated and negative for HIV, syphilis, hepatitis, and other diseases. According to the doctor's prescription, human milk from donors is processed and delivered to premature newborns, who have low birth weight and are at high risk.

5.2.3 Sample

Experiments were carried out with mature human milk donated by HMB from different mothers. The unpasteurized samples were pre-stored at $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ in sterile bottles and transported to the laboratory in a Styrofoam box filled with ice within an interval inferior to 1 h. All samples were grouped into 3 repetitions for physicochemical and structural analyses of their constituents. Additionally, these samples were submitted to homogenization tests, as shown in Figure 5.

5.2.4 Measurement

The techniques (Figure 1) and the combination of operating conditions to be studied were chosen based on the literature (Calvo et al., 2018) and previous tests. UTurrax, Mprocessor, and Oshaker work at different mechanical shear values. For example, in a high-pressure homogenizer (HPH), homogenization occurs when the liquid subjected to a pressure difference flows through a small orifice. On the other hand, cavitation, caused by ultrasonic waves, is the phenomenon responsible for promoting homogenization in UBath and UProbe (Calvo et al., 2018).

Fat retention in gastric tubes was studied utilizing two enteral feeding devices. These devices are usually found in NICU to feed low-weight and/or premature newborns, with difficulties breastfeeding, mostly because of their incapability or immaturity to synchronize

suckling, deglutition, and breathing. Figure 6 shows the gavage feeding devices used in our experiments to determine fat holding in gastric tubes.

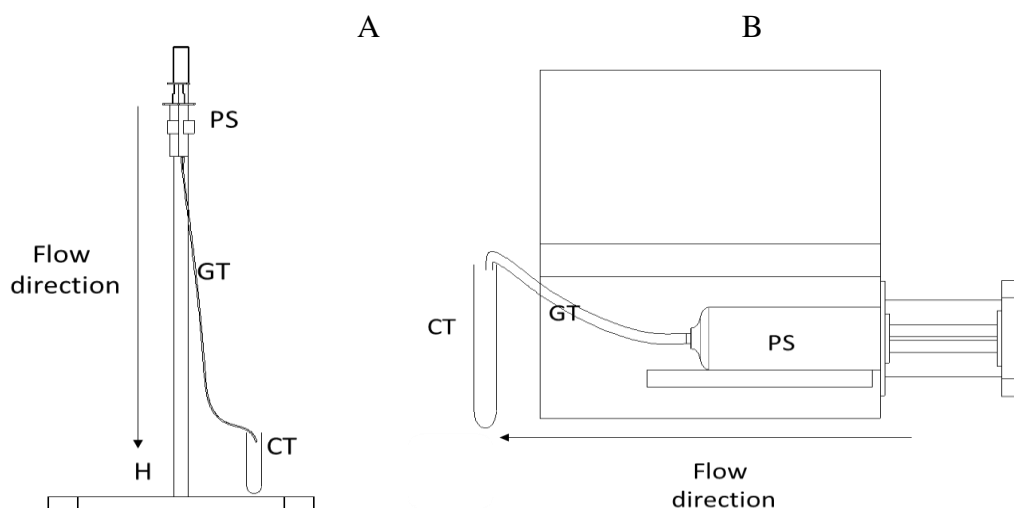


Figure 37: Simulated gavage feeding (A): By gravity - polypropylene syringe (PS) filled with 10 mL of human milk, 100-cm transparent polyvinyl chloride (PVC) (latex-free) gastric tube (GT). The filled syringe was placed in a holder (H) and positioned approximately 90 cm of distance from the collection tube (CT). After the initial thrust, the syringe emptied by the gravity action. Run time: 10 min. (B): By mechanical device (syringe infusion pump) – polypropylene syringe (PS), transparent extender tube (perfusor) (TP), 100-cm transparent) PVC tube (GT), a syringe (SR); infusion rate: 10.0 mL/h, run time: 1 h.

*Author's figure.

The two gavage feeding techniques were (i) gravity flow and (ii) continuous flow with programmed time or mechanical infusion through a pump (gastroclysis) (syringe infusion pump, Perfusor compact, B Braun Mcgaw, Germany). The infusion system was composed of a syringe infusion pump (20 mL, Mark Med, Brazil) and a compact 60 cm perfusor (Mark Med, Brazil) adapted to a 100 cm polyvinyl chloride gastric tube (latex-free, Mark Med, Brazil). The milk flow rate in the infusion pump was set at 10 mL/h. Milk fat content was evaluated before and after milk flowed through the feeding apparatus for each homogenization technique.

After homogenization, milk was characterized for pH, titratable acidity, fixed mineral residue, total dry extract, lactose, fat, and protein content (AOAC, 2019).

Titratable acidity was determined through the stoichiometry reaction between the standard alkaline titrant sodium hydroxide and the acidic constituents of human milk (AOAC, 2019).

Lactose quantification was determined by ion-exchange chromatography using a chromatograph equipped with an autoinjector (Metrohm®, 919 IC, Switzerland), an amperometric pulse detector (Metrohm®, 896, Switzerland), and MagiC Net 2.4® software (Lin et al., 2018).

Protein was measured by using the Kjeldahl method (AOAC, 2019).

Fat content was measured by the Gerber method (AOAC, 2019), whose principle is the breakage of fat micelles and the dissolution of casein, facilitating fat separation. This break occurs by adding sulfuric acid and isoamyl alcohol to milk placed into the Gerber butyrometer (AOAC, 2019).

5.2.5 Data collection

Human milk was transported under refrigeration, pooled, and filtered (45 µm, Whatman, Germany) to remove impurities. After filtration, milk was heated in a thermostatic bath (Tecnal, TE-056-MAG, Brazil) at 40 °C, homogenized using the different techniques mentioned above, pasteurized at 65 °C/30 min, cooled in an ice bath, frozen and stored at -18 °C (Consul Freezer, Practice 410 Biplax, Brazil) until further use. For usage in experiments, human milk was thawed in a water bath at 25 °C (Tecnal, TE-056-MAG, Brazil).

5.2.6 Data analysis

The behavior data of homogenized milk and the milk control were analyzed regarding structural aspects (size distribution of fat globules, d_{32} , specific surface area, and span) and percentage of fat retention in gastric tubes (Correa, 2017). The milk control corresponded to the PHM at pasteurization conditions of 65 °C and 30 min. The effect of the homogenization methods was evaluated based solely on one variable (time) for the homogenizers: ultrasonic bath (Ubath), high-pressure homogenizer (HPH), and mixer processor (Mprocessor). Milk was submitted to homogenization at different times (i) Ubath: 10, 20, and 30 min, (ii) Mprocessor: 0.5, 1.0, 2.0, and 3.0 min, and (iii) HPH: 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15 min. The experiments in each homogenizer were performed with 3 repetitions. The results were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test with a 95% confidence level (Leong et al., 2014).

The performances of the orbital shaker (OShaker), ultraturrax (UTurrax), and the ultrasonic probe (UProbe) were evaluated using the Doehlert matrix with two independent

variables, the intensity of homogenization (IH) and time of homogenization (TH) (Correa, 2017). The matrix had 7 points for each technique and 3 repetitions at the central point, totaling 9 experimental units per equipment. The combination of the Doehlert matrix allowed the evaluation of 5 IH and 3 TH levels: OShaker (100/14, 180/7, 180/21, 260/14, 340/7, 340/21, 400/14 rpm/min), UProbe (60/10, 65/5, 65/20, 70/10, 75/5, 75/20, 80/10% amplitude/min), and UTurrax (8000/1.0, 9500/0.5, 9500/1.5, 13000/1.0, 20500/0.5, 20500/1.5, 24000/1.0 rpm/min).

Size distribution of milk fat globules by laser diffraction analysis. The size distribution of the dispersed milk fat globules and their Sauter mean diameter (d_{32} ; μm), specific surface area (μm), and span (μm) were determined by laser diffraction (Gallier et al., 2015) using Mastersizer 2000 equipment (Malvern, WR14 1XZ, England).

Assessment of fat retention in gastric tubes. Fat retention in gastric tubes was studied utilizing two enteral feeding devices. These devices are usually found in NICU to feed low-weight and/or premature newborns, with difficulties breastfeeding, mostly because of their incapability or immaturity to synchronize suckling, deglutition, and breathing. Figure 3 shows the gavage feeding devices used to determine fat retention in gastric tubes. The two gavage feeding techniques were (a) gravity flow and (b) continuous flow with programmed time (infusion pump) through a pump (gastroclysis) (B Braun Mcgaw, Perfusor compact, Netherlands). The infusion system was composed of a syringe infusion pump (20 mL, Mark Med, Brazil) and a compact 60 cm perfusor (Mark Med, Brazil) adapted to a 100 cm polyvinyl chloride gastric tube (latex-free, Mark Med, Brazil). The milk flow rate in the infusion pump was set up at 10 mL/h. Milk fat content was evaluated before and after milk flowed through the feeding apparatus for each homogenization technique.

Evaluation of homogenization influence on the protein and fatty acid profiles. After homogenization, milk flowed into the gastric tubes of the gavage devices by gravity and infusion pump. Fat content was quantified before and after milk flowed through the gastric tubes. The "best response" of each equipment was the operation condition that prompted the lowest Sauter mean diameter (d_{32}) and percentage of fat retention (PFR), at a significant difference of 5% by the Tukey test. Human milk systems produced under the best response conditions were evaluated for changes in the profiles of fatty acids and proteins.

Protein profile analysis by electrophoresis (SDS-PAGE). SDS-PAGE electrophoresis was performed to characterize protein fractions under reducing conditions (95 °C, 5 min, 5% m/v of 2-mercaptoethanol). The analysis was carried out with a protein concentration of 4 mg/mL using a Mini-protean II system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) according

to the manufacturer's description. The gels were stained for 2 h in Coomassie brilliant blue R-250.

Fatty acid profile by gas chromatography (GC). Human milk lipids were extracted and converted to fatty acid methyl esters (FAMES) according to Bligh & Dyer (1959) methodology. Samples of human milk were diluted in 2:1 chloroform:methanol solution. The lipids were transesterified with the addition of 8 mol/L HCl solution in methanol, followed by incubation at 100 °C for 1 h. The FAMES were extracted using hexane, which was collected from the upper phase after centrifugation (Eppendorf, 5430, Germany) at 5000 g for 2 min. GC analysis was carried out using a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID) (Shimadzu, GC-2010, Japan) by direct injection of 1 µL of the sample. Helium gas was used as the dragging gas and maintained at a constant flow rate of 363 kPa. The FAMES were separated using a linear heating ramp from 60 °C to 330 °C, at a heating rate of 20 °C/min and high linear velocity for better peak resolution. Peak identification was confirmed by comparison with the standard FAME mix (SupelCo 37 FAME mix, Sigma-Aldrich, USA) (Silva et al., 2020).

Choice of homogenization method based on cost benefits and effects on human milk quality. A cost-benefit analysis was carried out to verify which homogenization method would be the most recommended to compose a processing line of a human milk bank.

Cost-benefit analysis. A preliminary cost estimative to introduce the homogenization stage in the human milk bank's processing was determined for all homogenizers tested. The costs were classified into acquisition, energy density, operating energy, processing, technician time, and equipment maintenance. The calculations were performed as follows.

Energy density (Wh/L): The homogenizers' energy density is a suitable parameter to compare homogenization efficiency in different devices. The homogenization performance is affected by the residence time and energy density (the power dissipated per fluid volume). The energy density (E_v ; Wh/L) was determined using Equation 2.

$$E_v (Wh/L) = \frac{P \cdot t}{V} \quad (2)$$

where P is the nominal power of the equipment (W), V is the sample volume (L), and t is the homogenization time (h).

Energy costs of operation (USD): The energy costs of operation were calculated following equation 3 based on 1 h of operation in each device. The values referring to the energy

(kWh) cost were used according to the local energy distributors' price and converted to the USD's exchange rate.

$$Ec (USD) = \frac{kW \cdot t \cdot 0.707}{\$} \quad (3)$$

In equation 3, Ec is the energy cost of operation (USD), kW is the power of the equipment (kW), t is the processing time (h), 0.707 is the Brazilian energy cost (Brazilian Real/kWh), and \$ is the Real to dollar conversion fee (Brazilian Real/USD).

Processing capacity (L/h): The processing capacity was calculated through the product between each homogenizer's nominal volume and the number of homogenization cycles in 1 h of operation, as follows:

$$Pc (L/h) = Nv \cdot Cn \cdot t \quad (4)$$

in which Pc is the volume processed per hour (L/h), Nv is the equipment nominal volume (L), Cn is the processing cycle number (-), and t is the homogenization time (h).

Technician time cost (USD): The technician time costs were calculated based on the cost of 1 h of the equipment operation and the number of employees needed to operate the equipment, as shown in Equation 5:

$$Oc (USD) = S \cdot N \cdot t \quad (5)$$

where Oc is the cost of the technician's labor to operate the equipment (USD), S is the technician's salary per hour (USD/h), N is the number of people needed to operate the equipment (-), and t is the homogenization time (h).

Equipment maintenance cost (USD): The homogenizer maintenance costs were calculated following the methodology adopted by Liu et al. (2020), considering 2% of the equipment acquisition cost.

5.3 Results

5.3.1 Characterization of human milk (HM)

Physicochemical characterization of pasteurized (control) and homogenized-pasteurized (treatments) human milk is shown in Table 6.

Table 6: Physicochemical parameters of human milk control (pasteurized) and homogenized milk at operating conditions for obtaining the smallest fat droplet

Treatments	Parameters – Mean (SD)							
	pH	Acidity (g/dL) Mean (SD)	Moisture (g/dL) Mean (SD)	Proteins (g/dL) Mean (SD)	Carbohydrates (g/dL) Mean (SD)	Fat (g/dL) Mean (SD)	Lactose (g/dL) Mean (SD)	Ashes (g/dL) Mean (SD)
Control^a (pasteurized)	7.01 (0.28) ^b	0.069 (0.006)	88.46 (0.88)	1.12 (0.04)	7.05 (0.88)	2.46 (0.05)	8.24 (0.23)	0.43 (0.23)
UBath	7.02 (0.22)	0.069 (0.003)	88.45 (0.81)	1.08 (0.04)	7.15 (0.83)	2.46 (0.06)	7.94 (0.99)	0.53 (0.24)
HPH	7.01 (0.23)	0.068 (0.007)	88.46 (0.79)	1.10 (0.05)	7.22 (0.79)	2.45 (0.03)	8.04 (0.53)	0.34 (0.21)
MProcessor	7.01 (0.27)	0.068 (0.006)	88.35 (0.84)	1.11 (0.04)	7.14 (0.90)	2.46 (0.05)	8.01 (0.67)	0.23 (0.19)
OShaker	7.01 (0.23)	0.069 (0.005)	88.43 (0.82)	1.09 (0.04)	7.07 (0.74)	2.46 (0.07)	7.84 (0.68)	0.45 (0.33)
UProbe	7.02 (0.28)	0.067 (0.007)	88.47 (0.89)	1.08 (0.03)	7.09 (0.99)	2.45 (0.04)	7.87 (0.83)	0.39 (0.25)
UTurrax	7.01 (0.27)	0.067 (0.006)	88.42 (0.88)	1.12 (0.03)	7.20 (0.89)	2.46 (0.04)	8.01 (0.33)	0.27 (0.13)
Literature value	6.9 (Perrella et al., 2021)	<0.08 (Brasil, 2008)	~88.0 (Perrella et al., 2021)	1.3 ± 0.4 (Radmacher and Adamkin, 2017)	8.0 (Lamb et al., 2020).	3.0 – 5.0 (Radmacher and Adamkin, 2017)	5.3 – 7.0 (Sun et al., 2013)	0.4 (Perrella et al., 2021)

Note. ^apasteurized and non-homogenized human milk. UBath (Ultrasonic bath). ^bThe means, in the same column, did not show significant difference by the Tukey test at 5% probability. HPH (High-pressure homogenizer). Mprocessor (Processor mixer). OShaker (Orbital shaker). Uprobe (Ultrasonic probe). Uturrax (Ultraturrax). Best answers: UBath: 5 min; High-pressure homogenizer: 17 min; Mixer processor: 3 min; Orbital shaker: 400 rpm / 14 min. Ultrasonic Probe: 75% amplitude/20 min.; Ultraturrax (rotor/stator): 20500 rpm 8/1.5 min. SD: standard deviation.

It is worth mentioning that milk composition values are close to those reported in the literature (Lamb et al., 2020; Meredith-Dennis et al., 2017; Perrella et al., 2021; Radmacher & Adamkin, 2017).

5.3.2 Size distribution of milk fat globules by laser diffraction analysis

Table 7 and figure 7 shows the Sauter mean diameter (μm), specific surface area (m^2/g), and span (μm) of nonhomogenized and pasteurized (control) and homogenized-pasteurized human milk provided by Mastersizer 2000.

Table 7: Data of human milk fat globules

	Operating condition	d ₃₂ (μm) Mean (SD)	Spec. surf. área (m ² /g) Mean (SD)	Span Mean (SD)
Control	-	4.51 (2.43)	2.29 (0.86)	6.981 (2.56)
	0.5 min	2.980 (0.038)	2.45 (0.12)	6.175 (0.100)
Mprocessor	1 min	1.845 (0.010)	3.25 (0.14)	2.995 (0.230)
	2 min	1.990 (0.010)	3.02 (0.54)	2.934 (0.430)
	3 min ^a	1.247 (0.030)	4.81 (0.10)	2.087 (0.074)
	10 min	1.119 (0.020)	5.36 (0.20)	2.323 (0.229)
Ubath	20 min	1.422 (0.010)	4.22 (0.27)	3.519 (0.070)
	30 min ^a	1.306 (0.010)	4.59 (0.11)	2.161 (0.040)
	3 min	2.405 (0.010)	2.49 (0.09)	2.592 (0.100)
	5 min	2.228 (0.020)	2.69 (0.02)	2.369 (0.011)
HPH	7 min	2.177 (0.009)	2.76 (0.03))	2.224 (0.020)
	9 min	2.086 (0.020)	2.88 (0.02)	2.309 (0.097)
	11 min	1.940 (0.014)	3.09 (0.05)	2.280 (0.045)
	13 min	1.840 (0.0130)	3.26 (0.04)	2.147 (0.037)
	15 min	1.484 (0.020)	4.04 (0.04)	2.139 (0.034)
	17 min ^a	1.197 (0.011)	5.01 (0.03)	1.949 (0.017)
	100 rpm/ 14 min	5.993 (0.017)	2.340 (0.04)	3.999 (0.007)
OShaker	180 rpm/ 7 min	5.003 (0.018)	2.049 (0.02)	3.303 (0.100)
	180 rpm/ 21 min	5.051 (0.009)	2.227 (0.06)	2.680 (0.031)
	260 rpm/ 14 min	4.933 (0.010)	2.138 (0.04)	2.796 (0.038)
	340 rpm/ 7 min	4.633 (0.037)	2.028 (0.04)	2.650 (0.062)
	340 rpm/ 21 min	5.314 (0.046)	2.08 (0.02)	2.358 (0.087)
	400 rpm/14 min ^a	3.648 (0.031)	1.893 (0.08)	2.068 (0.014)
	60 %/ 10 min	2.084 (0.012)	2.88 (0.04)	2.825 (0.007)
	65%/ 5 min	1.612 (0.011)	3.72 (0.45)	2.986 (0.031)
UProbe	65%/ 20 min	0.758 (0.065)	7.92 (0.23)	2.956 (0.019)
	70%/ 10 min	1.839 (0.094)	3.26 (0.32)	2,731 (0.016)
	75%/ 5 min	2.084 (0.101)	2.88 (0.14)	5.642 (0.027)
	75%/ 20 min ^a	0.568 (0.010)	10.60 (0.41)	1.459 (0.047)
	80%/10 min	0.919 (0.056)	6.53 (0.03)	2.810 (0.039)
	8000 rpm/1 min	2.199 (0.210)	2.73 (0.21)	3.422 (0.123)
	9500 rpm/0.5 min	3.477 (0.245)	1.73 (0.43)	5.007 (0.144)
UTurrax	9500 rpm/1.5 min	2.349 (0.110)	2.55 (0.31)	6.411 (0.211)
	13500 rpm/1 min	2.088 (0.039)	2.87 (0.11)	3.051 (0.141)
	20500 rpm/0.5 min	2.175 (0.020)	2.76 (0.21)	3.377 (0.121)
	20500 rpm/1.5min ^a	1.807 (0.013)	3.32 (0.11)	2.817 (0.087)
	24000rpm/1 min	1.901 (0.024)	3.16 (0.13)	3.037 (0.123)

Note. ^aSmaller d₃₂ values: best response of each homogenization method. UBath (Ultrasonic Bath). HPH (High-pressure homogenizer). Mprocessor (Processor mixer). OShaker (Orbital shaker). Uprobe (Ultrasonic probe). Uturrax (Ultraturrax). SD: standard deviation.

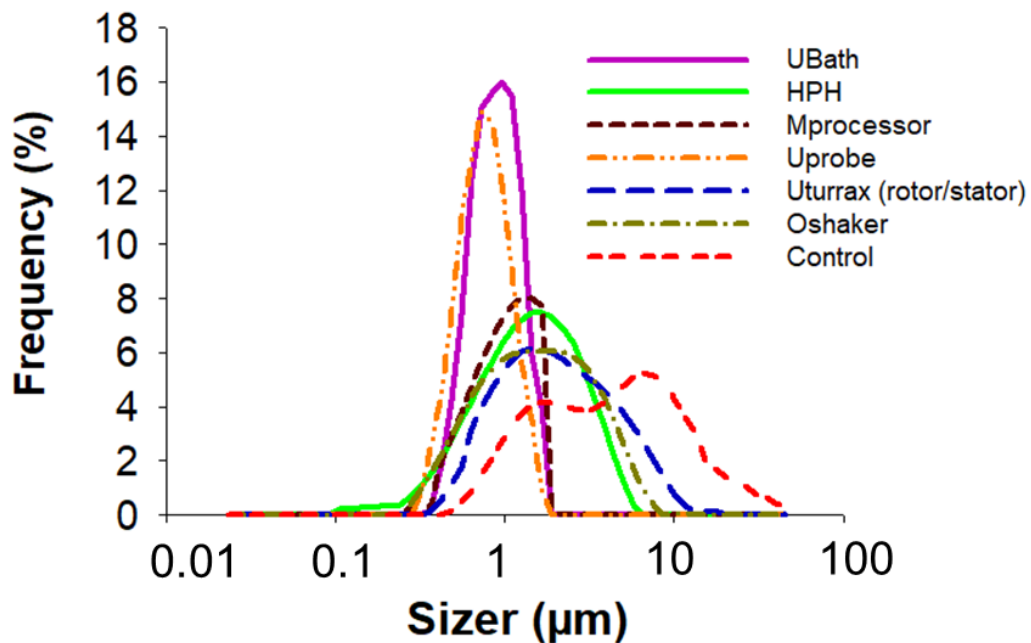


Figure 38: Fat globule size distribution at the condition of greater average size reduction. UBath: Ultrasonic bath (5 min). HPH: High-pressure homogenizer (17 min). Mprocessor: Mixer processor (3 min). Oshaker: Orbital shaker (400 rpm / 4 min). Uprobe: Ultrasonic probe (75% amplitude / 20 min). Uturrax: Ultraturrax (rotor/stator) (20500 rpm / 1.5 min).

Efficient homogenization processes are associated with the formation of small fat globule sizes, in addition to homogeneous average diameter distributions (lower span values). Thus, the best operating condition of each homogenizer was selected based on the smallest Sauter diameters. The pasteurized milk (control) presented bimodal distributions, with a mean diameter of $4.51 \pm 2.43 \mu\text{m}$. Regardless of the operating conditions, the mean diameter, specific area, and span of homogenized HM were significantly ($p < 0.05$) affected. In general, homogenization generated small droplets with narrower distributions.

Regarding the process parameters for the stirring mechanical homogenization, it was observed that the agitation time affected the mean size of the fat globules for the mixer processor. When using the orbital shaker, the agitation speed was more significant than the processing time. In addition, there were no differences in the globule sizes when considering the same speed but at different times. Conversely, for equal times, the increase in speed led to decreased fat globule size. Similar behavior was verified for ultraturrax homogenization.

Regarding the homogenization procedures using high pressure and sonication, all methods decreased the fat droplet mean size. Uprobe ($d_{3,2} = 0.57 \mu\text{m}$) and UBath ($d_{3,2} = 1.11 \mu\text{m}$) produced the smallest droplets, while HPH reduced the fat droplets to a minimum $d_{3,2}$ of $1.20 \mu\text{m}$.

5.3.3 Assessment of fat retention in gastric tubes and evaluation of homogenization influence on the protein and fatty acid profiles

Continuous syringe infusion pump - the percentage of fat retention in gastric tubes

The evaluation of the milk flow in the infusion pump for nonhomogenized human milk (control) resulted in a percentage of fat retention (PFR) of $50.95 \pm 1.05\%$. Figure 8A shows the PFR behavior in gastric tubes as a function of homogenization time for Mprocessor, UBath, and HPH. Figures 8B, 8C, and 8D show the surface responses to PFR using Oshaker, Uturrax, and Uprobe, respectively, as a function of homogenization time and stirring power/speed.

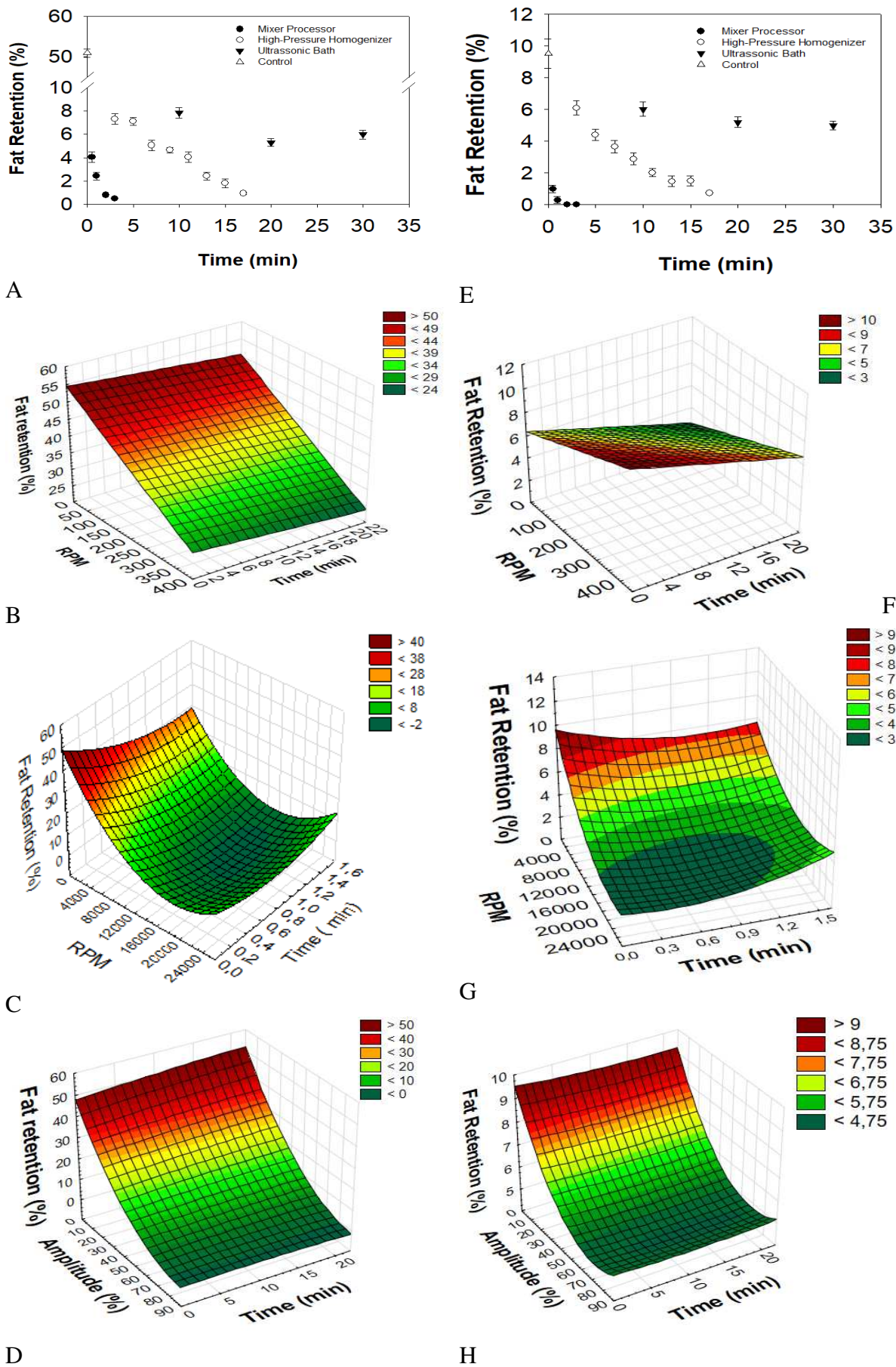


Figure 39: Fat retention behavior in feeding tube of syringe infusion pump

(A) mixer processor (MProcessor), ultrasonic bath (UBath), and high-pressure homogenizer (HPH); (B) orbital shaker (OShaker); (C) Ultraturrax (UTurrax); (D) Ultrasound probe (UProbe). Fat retention behavior in feeding tube of gavage by gravity: (E) MProcessor, UBath, and HPH; (F) Uturrax; (G) Uprobe (H).

Oshaker promoted a PFR of $28.57 \pm 0.9 \%$ at a binomial 400 rpm/14 min. Such operation conditions produced fat droplets with the smallest size, suggesting that it was the best operating condition of OShaker. The increase in homogenization time did not influence the PFR in gastric tubes ($p < 0.05$) for OShaker. The homogenization step in the other five methods generated a PFR of 10%. Commonly, the increase in homogenization time led to a reduction in PFR in gastric tubes. For instance, the use of the Mprocessor at a homogenization time of 3 min and rotational speed of 4800 rpm decreased the PFR by $99.41 \pm 0.07\%$, showing that the homogenization time is a factor to be considered for the PFR.

Gavage by gravity - the percentage of fat retention in gastric tubes

The determination of PFR in the gravity gavage device for human milk control resulted in a $9.52 \pm 0.92\%$ value. Regardless of the method, the PFR in the gavage apparatus by gravity was decreased upon milk homogenization. Mprocessor (Figure 8E) and Uprobe (Figure 8H) promoted minimum PFR values ($< 1.0\%$), while OShaker presented a maximum PFR (8.46 ± 0.39).

Additionally, the PFR in the gastric tube was significantly ($p < 0.05$) affected by the increase in homogenization time for the Mprocessor and HPH methods. On the other hand, for UBath, Oshaker, Uturrax, and Uprobe, the PFR values were not significantly ($p < 0.05$) affected by such techniques. Figures 8F, 8G, and 8H show the decrease in PFR with the increase in the level of homogenization intensity ($p < 0.05$) in all homogenizers.

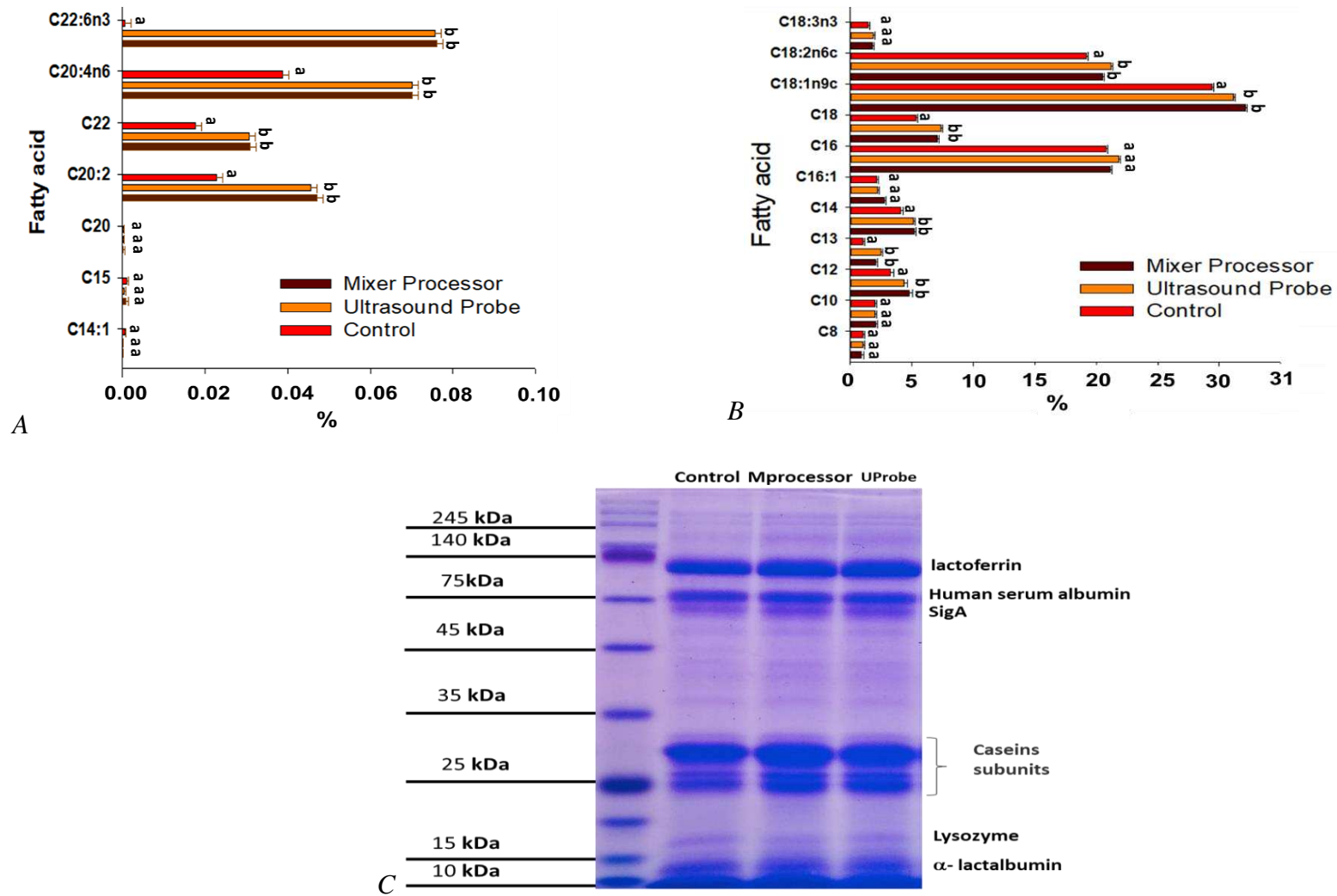


Figure 40: (A) Fatty acid profile (GC-FID): lower mean diameter and less fat holding for homogenized human milk. (B) Protein analysis (SDS-PAGE): less average diameter and less fat retention homogenized human milk. (C) SDS-PAGE gel of protein.

5.3.4 Choice of homogenization method on a cost-benefit basis and effects on human milk quality

The Mprocessor and Uprobe homogenizers were the most efficient techniques regarding the average size distribution of fat globules. They showed a homogeneous average diameter distribution and lower fat retention in gastric tubes by infusion pumping and gavage. Thus, the influence of these two homogenization methods on the fatty acid and protein profiles was analyzed since they are relevant nutrients for newborns. In addition, a cost-benefit analysis was performed to propose implementing one of these techniques in a human milk bank.

The fatty acid profile (Figures 9A and 9B) shows oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), and palmitic acid (C16:0) as the major human milk compounds. Milk homogenized by Mprocessor and Uprobe, compared with the control milk, revealed expressively higher contents of myristic acid (C14:0), tridecanoic acid (C13:0), lauric acid (C12:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), eicosadienic acid (C20:2), docosanoic acid (C22:0), docosahexaenoic acid (C22:6n3), and arachidonic acid (C20:4n6). After the infusion pump simulation, the significant difference ($p < 0.05$) between the fatty acid concentrations in the treatments and the control milk samples was mainly due to fat adherence in the gastric tube walls.

SDS-PAGE analysis revealed an abundance of lactoferrin, human serum albumin, casein subunits, and α -lactalbumin in milk control (PHM) and homogenized milk through Uprobe and Mprocessor, as shown in Figure 9C. Similar amounts of protein bands were observed for samples homogenized by Uprobe and Mprocessor compared to the control.

Data from Table 8 enable comparison of the homogenizers' capacity and performance based on cost-effectiveness.

Table 8: Implementing cost of homogenization in a human milk bank.

Equipment	Parameters					
	Equipment acquisition cost USD (<i>SD</i>)	Energy density Wh/L (<i>SD</i>)	Operation energy cost ^a USD (<i>SD</i>)	Processing capacity ^a L/h (<i>SD</i>)	Operating cost ^a USD (<i>SD</i>)	Maintenance cost USD (<i>SD</i>)
UBath (400 W)^b	450 (50)	33.3 (0.8)	0.05 (0.01)	12 (0.3)	13 (2)	9.5 (1.5)
HPH (1500 W)	12500 (500)	75.0 (2.5)	0.20 (0.01)	20 (0.5)	13 (2)	250 (10)
MProcessor (400 W)	35 (5)	26.6 (0.7)	0.05 (0.01)	15 (0.4)	13 (2)	0.7 (0.1)
OShaker (450 W)	1100 (250)	37.5 (0.9)	0.06 (0.01)	12 (0.3)	13 (2)	22 (5)
UProbe (750 W)	2950 (150)	150.0 (3.7)	0.10 (0.01)	5 (0.2)	13 (2)	59 (3)
Uturrax (rotor/stator) (800 W)	2235 (235)	53.3 (1.3)	0.10 (0.01)	15 (0.4)	13 (2)	44.7 (4.7)

Note. ^aCosts and capacity: per hour of processing. ^bEquipment power. UBath: ultrasonic bath. HPH: high-pressure homogenizer. Mprocessor: mixer processor. OShaker: orbital shaker. Uprobe: ultrasonic probe. Uturrax: Ultraturrax. SD: standard deviation.

The costs for acquisition, energy density, operating energy, processing, technician time, and equipment maintenance of each homogenizer were calculated per hour of processing. Noticeably, the homogenization energy density was different for all apparatus, whereas the technician time costs per hour to operate the equipment were the same. The expenses were higher for HPH, Uprobe, Uturrax, and OShaker and lower for Mprocessor and UBath. Furthermore, HPH had higher power and operating energy costs than Uprobe but a lower energy density cost at an equal processing time. Usually, high milk volumes are needed to work with HPH. However, the amount of human milk donated to HM banks is commonly low, making HPH an unfeasible homogenization technique.

Table 8 shows the total cost estimate of the studied devices. Considering a Mprocessor and an Uprobe working 8 h/day in a human milk bank, it is possible to show that (1) if the Mprocessor and the Uprobe have a processing capacity of 3,600 L/month and 1200 L/month, respectively, the operating energy cost for Mprocessor is approximately USD 8.00, while for Uprobe it is USD16.00; (2) the acquisition cost of Mprocessor is nearly 90 times less than the Uprobe acquisition cost; (3) the reduction of milk fat retention in gastric tubes, after the use of Mprocessor, was $99.23 \pm 0.07\%$; and (4) the reduction of milk fat retention in gastric tubes, upon the use of Uprobe was $99.95 \pm 0.0 \%$. Thus, compared to the Uprobe, Mprocessor

demanded the lowest implementation cost and represented an efficient way of reducing fat holding in gastric tubes.

Data from the fat retention reduction in gastric tubes (Figure 9A), combined with the analysis of economic performance (Table 8) of the six studied homogenizers, revealed Mprocessor as the most cost-effective equipment implementation in human milk banks.

5.4 Discussion

According to our results, milk physicochemical characterization (Table 6) was not affected by homogenization. However, the fat globule size (Table 7) and the PFR decreased significantly (5% by the Tukey test) in the feeding tube (Figure 8) upon homogenization regardless of the type of equipment. These results demonstrated no meaningful changes in human milk macronutrient composition after homogenization, suggesting that such technology may provide more stable systems, especially because of fat globule size reduction, which is a positive aspect of fluid milk products.

A homogenization method to a human milk bank must be efficient and present relatively low processing costs. Based on the present results, Mprocessor offered appropriate homogenization conditions to be used in a human milk bank compared to the other tested methods. This equipment promoted a decrease in fat droplet sizes, a homogeneous distribution of average fat globule diameters, a decrease in fat holding in the gastric tubes, and finally, it demanded low energy density and low cost for human milk processing. Accordingly, Mprocessor combined the best cost-effectiveness results and, therefore, would be the most appropriate to be used in HMB.

Additionally, the fat globules' mean sizes of pasteurized and nonhomogenized milk (control systems) were close to $4.51 \pm 2.43 \mu\text{m}$, within the range reported by Perrella et al. (2021) [3.14 to 3.51 μm] and Lopez et al. (2011) [4.2 to 6.5 μm]. The primary purpose of homogenization in milk processing is to reduce the fat globule size and, consequently, diminish the kinetic instability that leads to phase separation. An increase in fat droplet sizes was observed after the use of Ubath, suggesting that this homogenizer promoted milk overprocessing. The low stability of the fat droplets formed upon homogenization resulted in the establishment of larger droplets. Ultrasonic waves do not directly induce globule vibrations. Instead, they generate intense cavitation, which is characterized by pressure variation, followed by liquid bubble disruption. Ultrasound probes present advantages over ultrasound baths, mainly because the former concentrate their energy on a localized sample zone, thus providing

more efficient cavitation in the liquid (Priego - Capote & Castro, 2004). Therefore, if a system is subjected to high shear rates, the mechanical energy supplied can lead to a more unstable condition, promoting coalescence (Mercan et al., 2018).

Regarding HPH, although the power was greater than ultrasonic homogenization, the technique was not sufficient to reach droplet sizes less than 2 μm . This behavior could occur because the increase in energy was used to increase the turbulence and temperature, promoting fat globule coalescence (Marie et al., 2002).

For the Utrrax and Uprobe methods, the fat retained was affected by both the homogenization time and the power/agitation speed. The energy supplied was probably sufficient to promote fat droplet breakdown (Lee et al., 2013) and form new droplets of smaller diameters, making the systems less polydisperse. However, the Utrrax technique exhibited a slight increase in fat retention at 24000 rpm/min because the system was exposed to high homogenization speeds (Mercan et al., 2018), which may promote elevated shear rates responsible for not only breaking the droplets but also for favoring coalescence.

The interaction among fat droplets, along with the action of proteins as surfactants and the excess Gibbs-free energy on the surface, are factors that can negatively influence the disruption of fat globules in aqueous dispersions. To avoid coalescence, the power supplied in homogenization should overcome both the forces of interaction between fat globules and the excess Gibbs' energy (surface tension). In general, the literature has reported increased human milk stability after homogenization (Lopez & Ménard, 2011; Yao et al., 2015).

Regarding fat retention in the gastric tubes of the gavage and infusion pump feeding apparatus, the values obtained in the present work were higher than the results of 20 and 34% reported in the literature by Igawa et al. (2014). Such a difference is probably due to the PHM characteristics and the feeding apparatus.

In gavage feeding, milk flows in the gastric tubes by gravitational forces faster than the infusion pumping flow. Thus, in the gavage apparatus, the fat holding was lower, as expected. Besides, milk homogenization reduced fat retention to levels similar to those observed in the infusion system.

Efficient homogenization processes were associated with the formation of small fat globule sizes, in addition to homogeneous average diameter distributions (lower span values). Reducing the percentage of fat retention in the gastric tubes was also essential to choose the most efficient method. Mprocessor and Uprobe were more efficient on these criteria; thus, the fatty acid and protein profiles were tested.

The present study results were within the range of values found in mature milk literature in terms of physicochemical properties. Values of acidity (0.069 ± 0.006 g/dL lactic acid) and pH (7.01 ± 0.28) indicated that the control and homogenized milk samples did not present microbiological spoilage. It is worth mentioning that the different homogenization methods applied to human milk did not significantly ($p < 0.05$) change the milk composition. The values of pH, acidity, humidity, protein, carbohydrates, fat, lactose, and ash for homogenized human milk were also in the literature range for human milk (Lamb et al., 2020; Meredith-dennis et al., 2017; Perrela et al., 2021; Radmacher & Adamkin, 2017).

The best homogenization conditions did not promote changes in protein contents. However, they positively affected the fatty acid profile, increasing the main essential fatty acids in human milk. The fatty acid profile of the HPHM had concentration levels within the typical values reported by Chen et al. (2020). Arachidonic and docosahexaenoic acids play a role in developing the nervous system in early life (Lien et al., 2018). Furthermore, short- and medium-chain fatty acids can be hydrolyzed in the stomach and absorbed through the portal vein to quickly generate energy for infants (Billeaud et al., 2018).

In sum, it was possible to notice that homogenization promoted (i) the decrease of essential fatty acids retention in the gastric tubes, since PFR decreased; and (ii) greater availability of essential fatty acids for the newborn, who needs enteral feeding. In this way, essential fatty acids can be used in various physiological processes, promoting the newborn's proper growth. Consequently, the newborn's diet could be enriched in some fatty acids. In the face of such advantages, the homogenization step can be implemented in human milk banks.

SDS-PAGE showed that the protein bands were similar to those reported for chilled human milk (Zhang et al., 2020) and pasteurized human milk (Guerra et al., 2018). Hence, we can assume that homogenization did not affect the structure of the main proteins present in human milk. It is also important that the proteins do not undergo major structural modifications after processing since most of them present immunological properties (especially immunoglobulins, lactoferrin, and lysozyme), which are essential proteins for maintaining newborn health (Tobback et al., 2017). For example, lactoferrin is a glycoprotein with antimicrobial and immunomodulatory properties.

5.5. Limitations

This study's limitations were as follows: (i) the small volume (100 mL) of human milk used in each experimental unit; (ii) the devices used for simulating enteral feeding because only

prototypes were used; (iii) only milk from the mature lactation phase was used; and (iv) numerous comparisons of homogenization techniques, including instructions, duration, speeds, etc.

5.6 Conclusions

Homogenization is a potential technique to be added in human milk processing due to its adequacy to promote a decrease in fat retention in newborns' feeding tubes. The present study revealed a relationship between the homogenization step and the fat holding decrease in the gastric tubes. The Mprocessor and Uprobe devices showed the lowest fat retention in gastric tubes. The optimum operating condition of such an apparatus, regarding fat holding, did not alter the profiles of the main proteins and fatty acids in human milk. Mprocessor was the most suitable device to be added to a human milk processing line due to its high efficiency, simplicity of operation, and low acquisition and processing cost.

5.7 References

- Adamkin, D. H., & Radmacher, P. G. (2014). Fortification of human milk in very low birth weight infants (VLBW <1500 g birth weight). *Clinics in Perinatology*, *41*(2), p. 405–421. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2014.02.010>
- Adhisivam, B., Bhat, B. V., Rao, K., Kingsley, S. M., Plakkal, N., & Palanivel, C. (2018). Effect of holder pasteurization on macronutrients and immunoglobulin profile of pooled donor human milk. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, *32*(18), p. 3016-3019. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1455089>
- AOAC. (2019). AOAC Official Methods of Analysis. *Association of Official Agricultural Chemists*. Rockville, MD, *21th*, 3390. ISBN-10: 0935584897
- Billeaud, C., Boué-Vaysse, C., Couédelo, L., Steenhout, P., Jaeger, J., Cruz-Hernandez, C., Ameye, L., Rigo, J., Picaud, J. C., Saliba, E., Hays, N. P., & Destailats, F. (2018). Effects on fatty acid metabolism of a new powdered human milk fortifier containing medium-chain triacylglycerols and docosahexaenoic acid in preterm infants. *Nutrients*, *10*(6), p. 1–12. <https://doi.org/10.3390/nu10060690>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), p. 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- Borges, M. S., Oliveira, A. M. M., Hattori, W. T., & Abdallah, V. O. S. (2017). Quality of human milk is expressed in a human milk bank and at home. *Jornal de Pediatria*, *94*(4), p. 399–403. <https://doi.org/10.1016/J.JPED.2017.07.004>
- Brasil. Ministério da Saúde (2008). Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos. In D. R. de Mello (Ed. 1), *Organização do Banco de Leite e do Posto de Coleta*. Brasília, DF, 2008. <https://doi.org/Brasília>. <http://www.redeblh.fiocruz.br/media/blhanv2008.pdf>
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 05 de setembro de 2006
- Calvo, J., Lara, N. R. G., Gormaz, M., Peña, M., Lorenzo, M. J. M., Murillo, P. O., Sabaté, J. M. B., Samaniego, C. M., & Gayà, A. (2018). Recommendations for the creation and operation of maternal milk banks in Spain. *Anales de Pediatría (English Edition)*, *89*(1), p. 65.e1-6.e6. <https://doi.org/10.1016/J.ANPEDE.2018.01.007>

- Chen, Y. J., Zhou, X. H., Han, B., Li, S. M., Xu, T., Yi, H. X... & Wang, B. C. (2020). Composition analysis of fatty acids and stereo-distribution of triglycerides in human milk from three regions of China. *Food Research International*, 133, p. 109196. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109196>
- Cheng, C. (2018). Codex Alimentarius Commission. *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*. 1, p. 50-55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22376-7>
- Correa, K. de P. (2017). Estudo de técnicas de homogeneização do leite humano para diminuição da retenção da gordura em sondas nasogástricas. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, p.76. 2017.
- Davidson, J., & Elabiad, M. T. (2019). A simple intervention to decrease nutrient losses in continuous feeds with human milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 70(4), p. e81-e83. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002609>
- Demmelair, H., & Koletzko, B. (2018). Lipids in human milk. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 32(1), p. 57–68. <https://doi.org/10.1016/J.BEEM.2017.11.002>
- Dutta, S., Singh, B., Chessell, L., Wilson, J., Janes, M., McDonald, K., Shahid, S., Gardner, V. A., Hjartarson, A., Purcha, M., Watson, J., De Boer, C., Gaal, B., & Fusch, C. (2015). Guidelines for feeding very low birthweight infants. *Nutrients*, 7(1), p. 423–442. <https://doi.org/10.3390/nu7010423>
- Ellsworth, L., Sturza, J., & Stanley, K. (2020). An alternative to mother's own milk: maternal awareness of donor human milk and milk banks. *Journal of Human Lactation*, 37(1), p. 62-70. <https://doi.org/10.1177/0890334420939549>
- Escuder-Vieco, D., Espinosa-Martos, I., Rodríguez, J. M., Fernández, L., & Pallás-Alonso, C. R. (2018). Effect of HTST and Holder Pasteurization on the Concentration of Immunoglobulins, Growth Factors, and Hormones in Donor Human Milk. *Frontiers in Immunology*, 9(1), p. 2222. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02222>
- Gallier, S., Vocking, K., Post, J. A., Van De Heijning, B., Acton, D., Van Der Beek, E. M., & Van Baalen, T. (2015). A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136 (2), p. 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.024>
- García, L. N. R., Escuder-Vieco, D., Alonso Díaz, C., Vázquez Román, S., De la Cruz-Bértolo, J., & Pallás-Alonso, C. R. (2014). Type of Homogenization and Fat Loss during

- Continuous Infusion of Human Milk. *Journal of Human Lactation : Official Journal of International Lactation Consultant Association*, 30(4), p. 436–441. <https://doi.org/10.1177/0890334414546044>
- Goldfarb, M. F., Savadove, M. S., & Inman, J. A. (1989). Two-dimensional electrophoretic analysis of human milk proteins. *ELECTROPHORESIS*, 10(1), p. 67–70. <https://doi.org/10.1002/elps.1150100117>
- Guerra, A. F., Mellinger-Silva, C., Rosenthal, A. & Luchese, R. H. (2018). Hot topic: Holder pasteurization of human milk affects some bioactive proteins. *Journal of Dairy Science*, 101(4), p. 2814–2818. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13789>
- Gul, O., Saricaoglu, F. T., Mortas, M., Atalar, I. & Yazici, F. (2017). Effect of High-Pressure Homogenization (HPH) on microstructure and rheological properties of hazelnut milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41(6), p. 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.05.002>
- Ichihara, K., & Fukubayashi, Y. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, 51(3), p. 635–640. <https://doi.org/10.1194/jlr.d001065>
- Igawa, M., Murase, M., Mizuno, K., & Itabashi, K. (2014). Is fat content of human milk decreased by infusion? *Pediatrics International : Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 56(2), p. 230–233. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24847514>
- Lamb, R. L., Haszard, J. J., Little, H. M. J., Franks, A. F., & Meeks, M. G. (2021). Macronutrient composition of donated human milk in a New Zealand population. *Journal of Human Lactation*, 37(1), p. 114-121. <https://doi.org/10.1177/0890334420963666>
- Lavine, M., & Clark, R. M. (1989). The effect of short-term refrigeration of milk and addition of breast milk fortifier on the delivery of lipids during tube feeding. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 8(4), p. 496–499. <https://doi.org/10.1097/00005176-198905000-00013>
- Lee, L. L., Niknafs, N., Hancocks, R. D., & Norton, I. T. (2013). Emulsification: Mechanistic understanding. *Trends in Food Science & Technology*, 31(1), p. 72–78. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2012.08.006>
- Leong, T., Juliano, P., Johansson, L., Mawson, R., McArthur, S. L., & Manasseh, R. (2014). Temperature effects on the ultrasonic separation of fat from natural whole milk. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), p. 2092–2098. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.02.003>

- Lien, E. L., Richard, C. & Hoffman, D. R. (2018). DHA and ARA addition to infant formula: Current status and future research directions. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 128(1), p. 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.09.005>
- Lin, H., Li, S., Xu, C., Pang, M., & Wang, S. (2018). Simultaneous determination of galactose, glucose, lactose and galactooligosaccharides in galactooligosaccharides raw materials by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Food Chemistry*, 263, p. 29–36. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.04.092>
- Liu, C., Zhang, Q., & Wang, H. (2020). Cost-benefit analysis of waste photovoltaic module recycling in China. *Waste Management*, 118, p. 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.08.052>
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N., & Robert, B. (2011). Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry*, 125(2), p. 355–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.005>
- Marie, P., Perrier-Cornet, J. M., & Gervais, P. (2002). Influence of major parameters in emulsification mechanisms using a high-pressure jet. *Journal of Food Engineering*, 53(1), 43–51. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00138-8](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00138-8)
- Mercan, E., Sert, D., & Akin, N. (2018). Determination of powder flow properties of skim milk powder produced from high-pressure homogenization treated milk concentrates during storage. *LWT*, 97, p. 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.002>
- Meredith-Dennis, L., Xu, G., Goonatilleke, E., Lebrilla, C. B., Underwood, M. A., & Smilowitz, J. T. (2017). Composition and variation of macronutrients, immune proteins, and human milk oligosaccharides in human milk from nonprofit and commercial milk banks. *Journal of Human Lactation*, 34(1), p. 120–129. <https://doi.org/10.1177/0890334417710635>
- Narayanan, I., Singh, B., & Harvey, D. (1984). Fat loss during feeding of human milk. *Archives of Disease in Childhood*, 59(5), p. 475–477. <https://doi.org/10.1136/adc.59.5.475>
- Oliveira, S. C., Bellanger, A., Ménard, O., Pladys, P., Le Guar, Y., Henry, G... & Deglaire, A. (2017). Impact of homogenization of pasteurized human milk on gastric digestion in the preterm infant: A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition ESPEN*, 20 (1), p. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.05.001>
- Perrella, S., Gridneva, Z., Lai, C. T., Stinson, L., George, A., Bilston-John, S. & Geddes, D.

- (2021). Human milk composition promotes optimal infant growth, development and health. *Seminars in Perinatology*, 45 (2), p. 151380. <https://doi.org/10.1016/j.semperi.2020.151380>
- Picaud, J. C., & Buffin, R. (2017). Human milk-treatment and quality of banked human milk. *Clinics in Perinatology*, 44(1), p. 95–119. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.003>
- Priego-Capote, F., & Luque De Castro, M. D. (2004). Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 23(9), p. 644–653. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.06.006>
- Quan, W., Tao, Y., Qie, X., Zeng, M., Qin, F., Chen, J. & He, Z. (2020). Effects of High-Pressure Homogenization, thermal processing, and milk matrix on the in vitro bioaccessibility of phenolic compounds in pomelo and kiwi juices. *Journal of Functional Foods*, 64(4), p. 103633. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103633>
- Radmacher, P. G., & Adamkin, D. H. (2017). Fortification of human milk for preterm infants. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 22(1), p. 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2016.08.004>
- Silva, M. E. T., Correa, K. P., Martins, M. A., Matta, S. L. P., Martino, H. S. D., & Coimbra, J. S. R. (2020). Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. *Journal of Functional Foods*, 65, p. 103711. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103711>
- Sun, Y., Liang, X., Fan, J., & Yang, X. (2013). A highly selective 1,8-naphthalimide probe for recognition of casein based on aggregation induced emission enhancement characteristics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 253, p. 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.12.017>
- Tobback, E., Behaeghel, K., Hanouille, I., Delesie, L., Loccufier, A., Van Holsbeeck, A., Vogelaers, D., & Mariman, A. (2017). Comparison of subjective sleep and fatigue in breast- and bottle-feeding mothers. *Midwifery*, 47(September 2016), p. 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.midw.2017.01.009>
- Wang, L., Li, X., Hussain, M., Liu, L., Zhang, Y., & Zhang, H. (2020). Effect of lactation stages and dietary intake on the fatty acid composition of human milk (A study in northeast China). *International Dairy Journal*, 101, p. 104580. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104580>
- Yao, Yunping, Zhao, G., Zou, X., Huang, L., & Wang, X. (2015). Microstructural and lipid composition changes in milk fat globules during milk powder manufacture. *RSC Adv.*,

5(77), p. 62638–62646. <https://doi.org/10.1039/C5RA08247A>

Zhang, L., Wu, Y., Ma, Y., Xu, Z., Ma, Y., & Zhou, P. (2020). Food bioscience macronutrients, total aerobic bacteria counts, and serum proteome of human milk during refrigerated storage. *Food Bioscience*, 35, p. 100562. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.1005>

6. INFLUÊNCIA DA HOMOGENEIZAÇÃO SOBRE OS CONSTITUINTES DO LEITE HUMANO DURANTE O ARMAZENAMENTO

Resumo: A estabilidade cinética do leite homogeneizado deve-se à presença das cargas nas proteínas que causam a repulsão eletrostática entre as mesmas e, conseqüentemente, entre os glóbulos de gorduras envoltos por estas proteínas. Alguns princípios de técnicas de homogeneização, como cisalhamento mecânico e ultrassom, merecem destaque uma vez que apresentaram bons resultados quanto à redução da retenção de gordura. O objetivo desse estudo foi analisar a estabilidade do leite humano após a homogeneização e a sua influência sobre os constituintes do leite humano durante seis meses de armazenamento. O leite humano foi homogeneizado por ultrassom de sondas e processador *mixer*; cada tratamento foi dividido em sete diferentes frascos (T0, T1, T2, T3, T4, T5 e T6) e armazenado a -20 °C por seis meses. A cada mês um frasco era retirado e caracterizado com as análises de retenção de gordura, eletroforese, microscopia confocal, difração a laser e perfil de ácidos graxos por cromatografia de fase móvel gasosa. De acordo com os resultados obtidos, o leite humano ordenhado pasteurizado (não homogeneizado) apresentou menor concentração de gordura após o escoamento pelas sondas de alimentação em todos os tempos analisados. O diâmetro médio dos glóbulos de gordura aumentou com o tempo de armazenamento, conseqüentemente houve uma redução na estabilidade do leite humano ao longo do tempo de estocagem. Observou-se o decréscimo do conteúdo de proteínas no decorrer do armazenamento, sendo o percentual proteico maior no leite humano controle. As amostras de leite humano homogeneizado e pasteurizado apresentaram bandas de proteínas mais intensas. A homogeneização com ultrassom de sondas e processador *mixer* antes da pasteurização não alterou o perfil lipídico dos ácidos graxos presente no leite humano. Portanto, a homogeneização reduziu a retenção de gordura e não afetou a composição das proteínas do leite humano, sendo um protocolo com potencial para ser usado no processamento de leite humano.

Palavras chaves: leite humano, homogeneização, armazenamento

6.1 Introdução

O leite humano (LH) possui uma vasta composição de proteínas, lipídios, oligossacarídeos e minerais, sendo específico para cada indivíduo (Binte Abu Bakar et al., 2021), e é caracterizado pela extrema variabilidade de seus componentes nutricionais e bioativos. A composição do LH ao longo do tempo se modifica a fim de fornecer ao lactente uma nutrição para que o sistema imunológico do neonato complete adequadamente o seu desenvolvimento (Mosca & Giannì, 2017).

Na etapa de homogeneização do leite as membranas dos glóbulos de gorduras se rompem devido às forças empregadas no meio, levando a um aumento da área interfacial total. Uma vez que a quantidade de fosfolipídios presente nas membranas dos glóbulos de gorduras é insuficiente para reduzir a tensão superficial, as proteínas, principalmente as caseínas, se difundem para a superfície provocando a redução da tensão na interface. As proteínas se difundem para a interface pois apresentam função tensoativo (McClements & Gumus, 2016).

No leite, a estabilidade da emulsão deve-se à interação das proteínas com a interface do glóbulo de gordura. A estabilidade cinética do leite homogeneizado, dentre outros fatores, deve-se à presença das cargas nas proteínas (caseínas) que causam a repulsão eletrostática entre as mesmas e, conseqüentemente, entre os glóbulos de gordura envoltos por estas proteínas (McClements & Gumus, 2016). As proteínas presentes na interface dos glóbulos de gordura formam um filme viscoelástico, produzindo uma barreira física, que retarda a coalescência dos glóbulos de gordura. O efeito estérico também pode ocorrer devido ao enovelamento das proteínas do soro (Lam & Nickerson, 2013).

Técnicas de homogeneização, como o cisalhamento mecânico e o ultrassom, apresentam bons resultados na redução da retenção de gordura (Correa et al., 2021). Os equipamentos de cisalhamento que utilizam alta velocidade são comumente empregados para a homogeneização (McClements, 2005). A movimentação que essas técnicas proporcionam ao meio gera uma combinação de deslocamento longitudinal, rotacional e radial, formando gradientes de velocidade no líquido (McClements, 2005). Posto que uma propriedade de fluidos é a não resistência à tensão de cisalhamento, ocorre o rompimento dos glóbulos de gordura presentes no meio e o tamanho dos glóbulos de gordura torna-se mais homogêneo (McClements & Gumus, 2016). Por outro lado, as ondas ultrassônicas geradas são de alta intensidade e causam uma intensa taxa de cisalhamento e gradientes de pressão no meio. A ocorrência destes fenômenos origina zonas de turbulência e de cavitação que podem levar ao rompimento das gotículas de gordura (McClements, 2005). Neste contexto, o objetivo desse estudo foi analisar

a estabilidade da homogeneização bem como sua influência na composição do leite humano durante seis meses de armazenamento.

6.2 Metodologia

6.2.1 Fonte da matéria-prima

O leite humano utilizado foi obtido conforme descrição no projeto registrado no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa, por meio do CAAE 78516017.0.0000.5153, aprovado sob o parecer de número 2.763.503, publicado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos, com número de RBR-54qqz5, e registrado no Comitê de Ética do Hospital São Sebastião (HSS), seguindo a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O leite humano cru ordenhado doado foi transportado em caixas isotérmicas com gelo, obedecendo à cadeia de frio, para o Laboratório de Operações e Processos (LOP) do Departamento de Tecnologia em Alimentos (DTA) localizado na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Todo o material foi armazenado em frascos de vidro, de acordo com a regulamentação da RDC 171/ 2016. O volume de leite humano necessário para todas as análises foi obtido pela mistura das diferentes amostras em um único frasco, formando o *pool* de leite humano. Em seguida o *pool* foi homogeneizado manualmente, durante um minuto, com o auxílio de um bastão de vidro.

6.2.2 Caracterização da matéria-prima

O *pool* foi caracterizado quanto à sua composição centesimal para a quantificação de umidade (AOAC 925,09, 2005), cinzas (AOAC 923,03, 2005) e proteína (AOAC 920,87, 2005). O teor de carboidratos foi obtido por diferença (AOAC, 2005). Também foram realizadas análises de acidez titulável e de potencial hidrogeniônico (pH).

Teor de gordura

O teor de gordura foi avaliado utilizando as técnicas de Crematócrito (Brasil, 2008) e Gerber (Brasil, 2006) a cada 30 dias durante os 6 meses de armazenamento do leite humano ordenhado homogeneizado e pasteurizado (LHOHP).

Método crematócrito: A gordura (creme) foi separada do leite por meio de uma centrífuga (Inbras, Micro Hematócrito Centrífuga MH 11,5 i, Brasil) a 12.000g por 15 min. Depois foi medida a altura da gordura do creme por meio de uma régua e o conteúdo de creme foi calculado pela equação 1 (Mizuno et al., 2009):

$$TC = acc * \frac{100}{atc} \quad (1)$$

Em que: TC é o teor de creme (%), acc é a altura da coluna de creme (mm) e atc é a altura total da coluna (mm).

Método Gerber: A metodologia é baseada na digestão da caseína pelo ácido sulfúrico. Em um béquer foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico, 11 mL de leite humano e 1 mL de álcool isoamílico. O butirômetro foi vedado e o conteúdo homogeneizado de modo a promover a mistura completa dos líquidos. A mistura foi centrifugada durante cinco minutos a 1200 rpm e mantida em banho-maria a 65 °C por cinco minutos para facilitar a visualização da porcentagem de gordura. A leitura da quantidade de gordura presente no leite foi lida diretamente na escala graduada do butirômetro (Brasil, 2006).

Teor de lactose

Um grama de cada amostra de leite humano foi pesado (balança analítica, Shimadzu, AY220 Brasil) em um béquer e adicionado 50 g de água ultrapura (Direct QUV3, Millipore, Itália). O sistema foi mantido sob agitação mecânica (MA085, Tecnal, Brasil) por 1800 s, homogeneizado em banho ultrassônico (UNIQUE, USC-1400A, Brasil) por 300 s, e diluído com água ultrapura (1:20). Em seguida 10 microlitros das amostras foram injetados no coletor de amostras e analisados por 900 s a 305,15 K. A lactose foi determinada pela técnica de cromatografia troca iônica. O cromatógrafo de íons é equipado com um auto-injetor (Metrohm, 919 IC, Suíça), um detector de pulso amperométrico (Metrohm, 896, Suíça) e o software MagiC Net 2.4. O dissacarídeo foi separado por meio de uma coluna analítica Carb 2 (Metrohm, Carb 2) de 5 µm, 150 x 4,0 mm. O eluente utilizado foi NaOH 0,2 mol/L na vazão de 0,5 mL/s. O dissacarídeo foi identificado e quantificado pela comparação dos tempos de retenção e área dos picos conhecidos dos padrões de α-lactose (Sigma, 99 %; USA) previamente injetados (Lin et al., 2018)

6.2.3 Processamento do leite humano

Homogeneização

A homogeneização foi conduzida visando reduzir o diâmetro médio de glóbulos de gordura, retardar a coalescência e conseqüentemente diminuir a retenção de gordura nas sondas de alimentação (Correa et al., 2021) e melhorar a absorção de lipídios *in vivo*. Foi utilizado o processador *mixer* equipado com uma hélice com rotação variável, com limite superior de 4800

rpm. A hélice provocou o cisalhamento do líquido levando a um corte da membrana do glóbulo de gordura e, conseqüentemente, à redução no tamanho deles. Também foi utilizada a técnica de ultrassom de sondas onde o leite humano cru a 40 °C foi homogeneizado por sonicação (sonicador ultrassônico VCX750, Church Hill RD. Newtown, EUA) utilizando uma sonda de 13 mm, frequência de 20 kHz, intensidade de 75% por 20 min. A homogeneização ocorreu na temperatura de 40 °C por 3 min.

Pasteurização

A pasteurização lenta foi conduzida no binômio temperatura/tempo de 65 °C/30 min, como recomendado por BRASIL (2008). A pasteurização foi realizada em frascos de vidro com tampas de plástico, em banho-maria (Tecnal, 184, Brasil). A cada 5 minutos os frascos eram agitados manualmente a fim de manter a uniformização do aquecimento do fluido. Após a pasteurização, os frascos foram imersos em banho de gelo a temperatura de 4 °C.

O leite humano ordenhado homogeneizado pelo processador *mixer* e pasteurizado (LHOHP) foi identificado nas análises como P.Mixer e aquele homogeneizado por ultrassom de sondas e pasteurizado foi identificado como U.Sondas (LHOHP). A amostra de leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP) foi identificada como Controle.

Estocagem

As amostras de leite humano ordenhado, pasteurizado (LHOP) e homogeneizado (com o processador *mixer* e com ultrassom de sondas) e pasteurizado (LHOHP), foram estocadas a -3 °C por um período de 6 meses, que é tempo máximo de estocagem do LH pelo regulamento básico do BLH. A cada 30 dias, amostras do LH armazenadas eram coletadas e analisadas (Brasil, 2008).

6.2.4 Simulação da alimentação

A simulação da alimentação foi realizada utilizando um protótipo de alimentação com bomba de infusão (Figura 3) a fim de avaliar a retenção do leite humano nas sondas de alimentação durante a simulação da etapa de alimentação do lactente. O conteúdo de gordura das amostras de leite humano (Controle, P.Mixer e U.Sondas) foi quantificado antes e após o escoamento pelo protótipo durante seis meses nos tempos T0 = 0, T1 = 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias.

6.2.5 Difração a laser

A técnica de difração a laser foi utilizada para caracterizar o diâmetro médio dos glóbulos de gordura e, conseqüentemente, avaliar a eficiência da etapa de homogeneização (Gallier et al., 2015). As distribuições de tamanho dos glóbulos de gordura foram determinadas nas três amostras durante o período de 6 meses nos tempos T0 = 0, T1 = 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias. O equipamento utilizado para as análises foi o Mastersizer 2000 (Malvern WR14 1XZ, Inglaterra).

Um volume de 10 mL de LH foi agitado por 2 min. (1500 rpm) em um vórtex (AP 56, PHOENIX, Brasil); diluído em um tampão de EDTA/NaOH (35 mM, pH 7) para dissociação das micelas de caseína; filtrado (filtro qualitativo Whatman TM n° 1); diluído em um volume de 700 mL de água ultrapura (35X) e então transferido para um béquer para análise de difração (Michalski et al., 2006).

6.2.6 Análise dos glóbulos de gordura por microscopia confocal de varredura à laser

A técnica de microscopia confocal permite visualizar a distribuição dos tamanhos dos glóbulos de gordura e a ocorrência de interação da proteína com a nova membrana do glóbulo formado. A coloração dos glóbulos de gordura foi realizada segundo Lopez *et al.* (2011). Os lipídios foram corados com o vermelho do Nilo e visualizados em microscópio confocal de varredura (LSM 510 META, Alemanha). A análise das amostras de leite humano (Controle, P.Mixer e U.Sondas) foi realizada a cada 30 dias durante os 6 meses de armazenamento (T0 = 0, T1 = 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias).

6.2.7 Eletroforese SDS-Page

As proteínas do leite humano foram extraídas e levadas à análise de eletroforese para o seu fracionamento e identificação. Para tanto, o gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) foi utilizado (Goldfarb et al., 1989). As proteínas foram identificadas a partir da massa molecular da amostra, comparada a com o padrão de massa molecular TrueColor (Sinapse biotecnologia, Brasil). Por meio dessa técnica, as proteínas presentes nas diferentes amostras de leite humano foram caracterizadas e o conteúdo delas foi comparado com o Controle (LHOP).

6.2.8 Determinação de ácidos graxos

A determinação de ácidos graxos do leite humano foi realizada a fim de analisar a influência da exposição de ácidos graxos após a homogeneização, quanto à qualidade lipídica do produto. A extração de lipídios foi realizada segundo Ichihara e Fukubayashi (2010). Uma massa de 10 mg de C11 (padrão) foi diluída em 1 mL de hexano. Dessa suspensão diluída foram retiradas alíquotas de 100 μ L que foram então adicionadas em tubos de ensaio e levados à estufa para secar. Após secos, adicionou-se a cada tubo de ensaio, 10 μ L das amostras de leite (Controle, P.Mixer e U.Sondas) e 60 μ L de tolueno. As misturas foram agitadas em vórtex, e adicionadas de 900 μ L de HCl 8% em metanol e 4,5 mL de metanol. Em seguida as amostras foram novamente agitadas em vórtex. Cada amostra foi adicionada de 1 μ L de água deionizada, de 2 mL de hexano e foi então aquecida em estufa a 65 °C por 12 h. Dessa mistura formada, 1 μ L do sobrenadante foi transferindo para um Eppendorf contendo 0,1 g de sulfato de sódio anidro. A amostra foi então centrifugada a 5000 rpm por 10 min. Por fim, 200 μ L da mesma foram diluídos em 800 mL de hexano e reservados para análise cromatográfica. O volume de 1 μ L do sobrenadante foi injetado em um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID) (Shimadzu, GC-2010, Japão) e uma coluna capilar nº 112-88A7 de 100 m x 0,25 mm (SP-2560, Sigma-Aldrich, EUA). O gás hélio foi usado como gás de arraste e mantido a 363 kPa. Os ésteres metílicos foram separados usando uma rampa de aquecimento linear de 60 °C a 330 °C, a uma taxa de aquecimento de 20 °C/min e alta velocidade linear para melhor resolução do pico. A identificação do pico foi confirmada por comparação com o mix de ésteres metílicos padrão (SupelCo 37 FAME mix, Sigma-Aldrich, EUA).

6.2.9 Planejamento estatístico

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições e três replicatas. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o *Statistical Analysis Software* (Versão 9.0, SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA). Para todos os resultados foi considerado o valor de 0.05% de probabilidades pelo teste de Tukey.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Caracterização físico-química e microbiológica

A caracterização dos macronutrientes do *pool* formado apresentou valores de gordura de $2,57 \pm 0,03\%$, proteína de $1,35 \pm 0,0 \%$, lactose de $6,55 \pm 0,03\%$ e resíduo mineral fixo de

0,3± 0,03%. Esses resultados estão dentro da faixa de composição do LH maduro descrita na literatura (Boyce et al., 2016; Correa et al., 2021). Assim, o *pool* formado pode ser caracterizado como leite humano maduro. Observa-se que a concentração de lactose no leite humano foi de 6,7 g/100 mL, o que supera a concentração de lactose encontrada em outras espécies (Mosca & Giannì, 2017).

Com relação à caracterização microbiológica, as amostras dos leites estudados (Controle, P.Mixer e U.Sondas) apresentaram valores de contagem para coliformes a 35 °C (totais) e 45 °C (termo-tolerantes) < 3,0 NMP/g, após a pasteurização. Este valor está dentro do esperado pelos critérios da Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (Brasil, 2008). A pasteurização do leite humano envolve o aquecimento a 65 °C durante 30 min, condição suficiente para destruir os microrganismos patogênicos e reduzir a taxa de deterioradores.

6.3.2 Retenção de gordura nas sondas

A simulação de alimentação dos recém-nascidos em um protótipo semelhante ao utilizado nas unidades de tratamento intensivo neonatal permitir avaliar a influência do tempo de congelamento/descongelamento (T0 = 0, T1= 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias) sobre a retenção de gordura nas sondas. Os dados obtidos podem ser observados na figura 10.

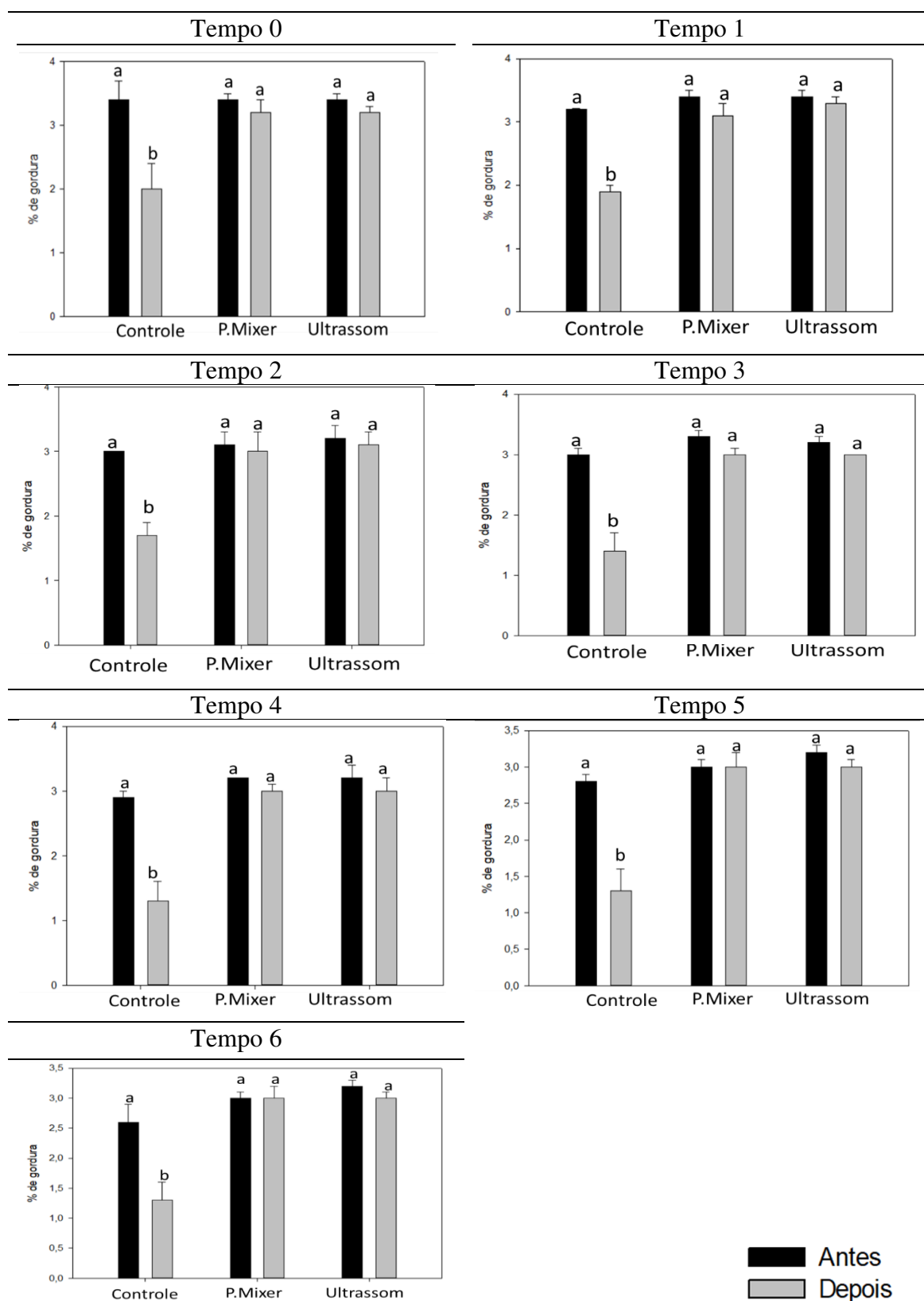


Figura 41: Comparação da porcentagem de retenção de gordura entre os três tratamentos antes e após o escoamento do leite humano pela sonda de alimentação para cada mês. T0 = 0, T1= 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias durante o armazenamento. Tratamentos: (P.Mixer) leite humano ordenhado homogeneizado pelo processador *mixer* e

pasteurizado; (U.Sondas) leite humano ordenhado homogeneizado por ultrassom de sondas e pasteurizado; (Controle) leite humano ordenhado pasteurizado.

Para os tratamentos no processador *mixer* e no ultrassom de sondas, os resultados indicam que o teor de gordura do leite humano (%), antes e após o escoamento pelo protótipo, não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em nenhum tempo avaliado. Entretanto, a concentração de gordura da amostra Controle apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey em todos os tempos. A homogeneização pelos equipamentos processador *mixer* e ultrassom de sondas gera uma força de cisalhamento no sistema que faculto o rompimento da membrana do glóbulo de gordura, levando à redução de tamanho dele. Uma vez que o glóbulo de gordura reduz de tamanho, sua área interfacial é aumentada (Liu et al., 2021; McClements & Gumus, 2016), mas como não há fosfolipídios suficientes no meio para compor a membrana dessa nova área, as proteínas que possuem função de tensoativo migram para a interface do glóbulo de gordura/água, reduzindo assim a tensão superficial do meio (Lam & Nickerson, 2013).

Em um segundo momento foi feita a comparação da percentagem de gordura do leite humano antes do escoamento pelas sondas e dentro do mesmo tratamento, variando o tempo como observado na Figura 11.

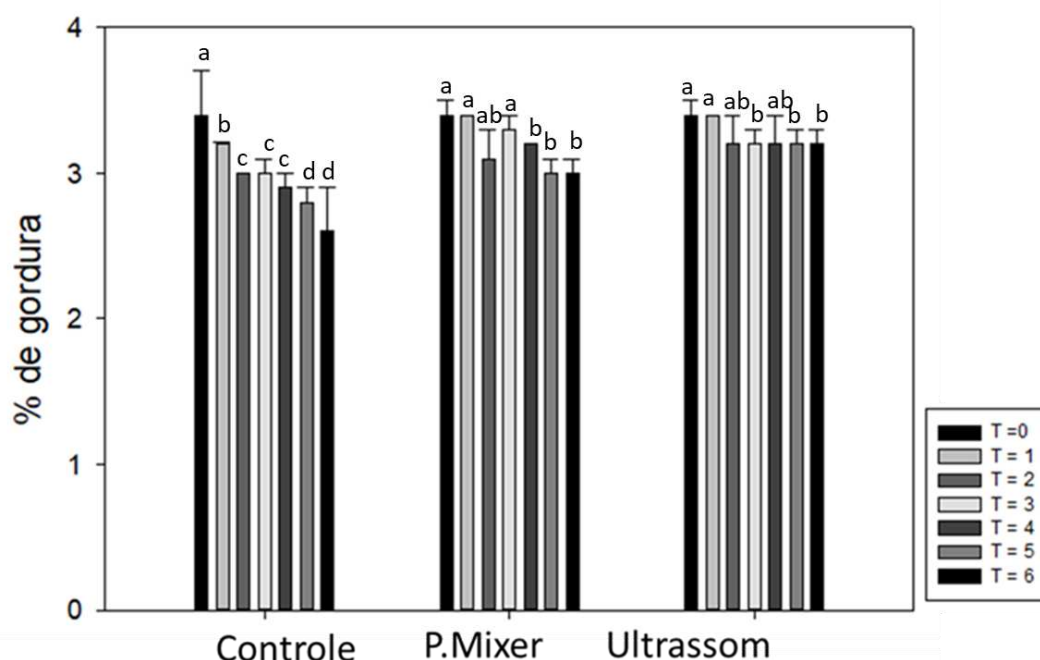


Figura 42: Percentagem de retenção de gordura durante os seis meses de armazenamento para os três tratamentos (Controle, P.Mixer e U.Sondas). T = tempo, T0 = 0, T1= 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias.

Com base nos resultados, o Controle apresentou redução na porcentagem de gordura significativa ($p > 0,05$) após o armazenamento + congelamento. A redução na porcentagem de gordura foi de $23,52 \pm 2,05\%$. Um estudo anterior da literatura reporta valores com diferenças médias entre o dia 0 pós-pasteurização e o dia 180, de $6,2\%$ no conteúdo de gordura e 5% de redução no conteúdo de energia calórica (García et al., 2013). As amostras de LHOHP não apresentaram redução significativa na concentração de gordura após o escoamento pelo protótipo no decorrer do tempo ($T_0 = 0$, $T_1 = 30$, $T_2 = 60$, $T_3 = 90$, $T_4 = 120$, $T_5 = 150$ e $T_6 = 180$ dias). Uma explicação para este comportamento é que a homogeneização retarda o fenômeno de coalescência, evitando assim a separação da fase lipídica e, conseqüentemente, reduz a adesão da gordura nas sondas de alimentação (Correa et al., 2021; McClements & Gumus, 2016).

Sabe-se que o uso do leite humano para a alimentação de recém-nascidos prematuros é primordial, ocasionando uma série de benefícios para o lactente, dentre eles o ganho de peso. De acordo com a literatura, lactentes prematuros quando alimentados exclusivamente com leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP) utilizaram a alimentação por sondas por um menor tempo e apresentaram menor taxa de morbidade do que os lactentes prematuros alimentados com fórmulas (Cacho et al., 2017; Cristofalo et al., 2013; Sullivan et al., 2010). Buscando preservar a composição do LH, a homogeneização é uma alternativa para o processamento do LHO, uma vez que de acordo com o presente estudo, o leite humano ordenhado homogeneizado e pasteurizado (LHOHP) apresentou maior concentração de gordura após o escoamento pelas sondas de alimentação quando comparado ao LHOP. Além disso, também foi relatado que o efeito do congelamento/descongelamento não afetou significativamente a redução da concentração de gordura presente nas amostras do LHOHP ($p < 0,05$). Esse resultado é importante uma vez que a gordura é o principal constituinte do LH responsável pelo ganho calórico dos lactentes (Arslanoglu et al., 2019).

6.3.3 Microscopia Confocal e Difração a laser

As técnicas de microscopia confocal e difração a laser foram utilizadas para analisar o aspecto estrutural dos glóbulos de gordura de leite humano, como visto nas Figuras 12 e 13.

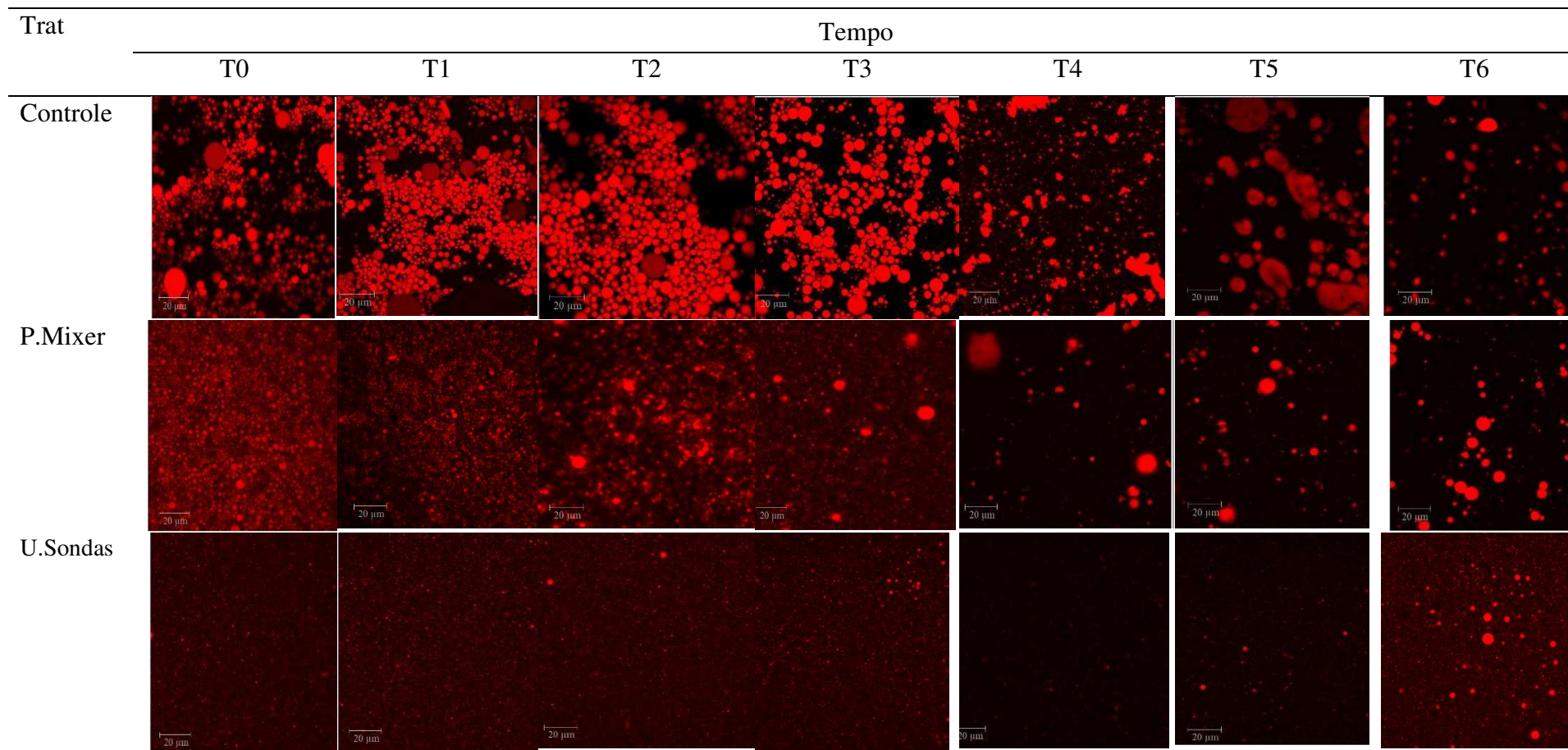


Figura 43: Imagens de microscopia confocal a laser durante 6 meses (T0 = 0, T1= 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias). P.Mixer = leite humano ordenhado homogeneizado pelo processador *mixer* e pasteurizado; U.Sondas = leite humano ordenhado homogeneizado por ultrassom de sondas e pasteurizado; Controle = leite humano ordenhado pasteurizado

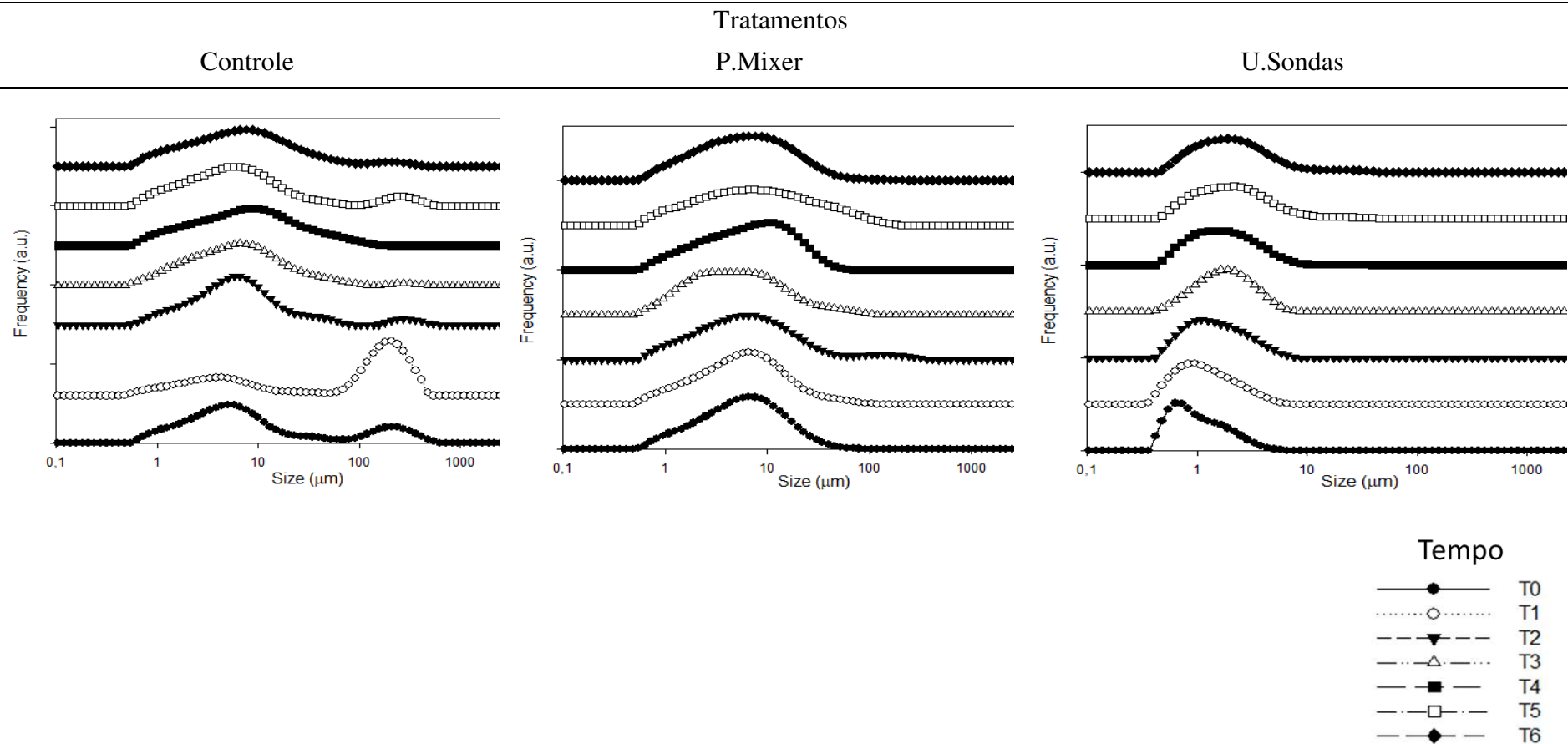


Figura 44: Representação dos dados obtidos pela técnica de difração a laser para os três métodos estudados durante 6 meses de armazenamento (T0 = 0, T1= 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias). Métodos: (P.Mixer) leite humano ordenhado homogeneizado pelo processador *mixer* e pasteurizado; (U.Sondas) leite humano ordenhado homogeneizado por ultrassom de sondas e pasteurizado; (Controle) leite humano ordenhado pasteurizado.

Com base nas imagens apresentadas observa-se que o tratamento ultrassônico apresentou gotículas de gordura menores do que o controle e o LHOHP homogeneizado com o processador *mixer*. O processador *mixer* apresentou gotículas com tamanhos mais uniformes e menores que o controle. Pode -se inferir que a homogeneização por ultrassom de sondas foi mais eficiente, uma vez que o equipamento proporciona uma taxa de cisalhamento maior ao meio (Correa, 2017). Esse fato contribuiu para obtenção de glóbulos de gordura com menores diâmetros médios, reduzindo assim a velocidade da coalescência (Scudino et al., 2020). Esse comportamento se propagou durante os seis meses de armazenamento.

Conforme observado nos resultados da microscopia confocal a laser (Figura 12), os lipídios estão presentes no leite humano sob a forma de gotículas esféricas. As micrografias com corante fluorescente confirmaram que a fração lipídica está localizada na região central das gotículas, o que está de acordo com seu caráter hidrofóbico. Além disso, através da análise dessas imagens é possível observar claramente a redução do diâmetro médio das gotículas de gordura devido ao efeito da homogeneização. A redução do diâmetro médio é confirmada por meio da técnica de difração a laser.

Como pode ser observado na Figura 13 o controle apresenta maiores valores para o diâmetro médio, além de duas populações de valores. Esse fato, evidencia a desuniformidade dos glóbulos de gordura da amostra. A distribuição normal é considerada mais homogênea em um sistema quando apresenta pico único com menor área da base. Observa-se que com o passar dos dias a base do pico aumentou. De acordo com a literatura a partir de 120 dias a estrutura do glóbulo de gordura do leite homogeneizado se desestabiliza favorecendo a coalescência, o que leva a uma heterogeneidade do meio (Lopez et al., 2010; Yao et al., 2015). Sabe-se que os glóbulos de gordura (diâmetro 1-10 μm) são quebrados em pequenos glóbulos (diâmetro $< 1 \mu\text{m}$), resultando na destruição da membrana do glóbulo de gordura (Qi et al., 2015).

6.3.4 Perfil lipídico

O acompanhamento do perfil lipídico do leite humano ordenhado pasteurizado, leite humano ordenhado homogeneizado pelo processador mixer e pasteurizado (P.Mixer) e leite humano ordenhado homogeneizado por ultrassom de sondas e pasteurizado (U.Sondas), durante os 6 meses de armazenamento gerou os dados da Tabela 10.

Tabela 9: Efeito do armazenamento na concentração de ácidos graxos para os três tratamentos estudados. P.Mixer, leite humano ordenhado homogeneizado pelo processador *mixer* e pasteurizado; U.Sondas, leite humano ordenhado homogeneizado por ultrassom de sondas e pasteurizado; Controle, leite humano ordenhado pasteurizado.

Ácidos graxos	Tempo																				
	T0			T1			T2			T3			T4			T5			T6		
	Cont.	P.Mixer	U.Sondas	Cont.	P.Mixer	U.Sondas	Cont.	P.Mixer	U.Sondas	Cont.	P.Mixer	U.Sondas	Cont.	P.Mixer	U.Sondas	Controle	P.Mixer	U.Sondas	Controle	P.Mixer	U.Sondas
Ácidos Graxos saturados																					
C8:0 (ácido octanoico)*	0,38	0,59	0,57	0,37	0,47	0,54	1,61	0,47	0,18	3,61	2,47	3,18	3,15	3,12	2,11	2,14	4,12	3,12	3,11	3,11	4,11
C10:0 (ácido decanoico)*	1,52	1,66	1,71	1,09	1,66	1,71	1,32	1,66	1,61	1,02	1,66	1,61	2,44	2,35	2,2	2,44	3,25	2,2	2,44	3,25	3,2
C12 (ácido dodecanoico)	6,34	6,38	6,47	6,34	6,38	6,42	6,91	6,38	6,4	6,87	6,38	6,4	6,65	5,54	5,32	6,05	5,54	5,32	6,05	5,54	5,32
C14:0 (Ácido tetradecanoico)	5,89	6,14	6,15	5,48	6,14	6,15	5,84	6,14	6,11	5,67	6,14	6,11	6,23	5,96	5,86	6,23	5,96	5,86	6,23	5,96	5,86
C16:0 (ácido hexadecanoico)	22,3	22,15	21,97	22,3	22,32	21,97	22,77	22,37	22,77	22,54	22,31	22,81	23,57	22,69	22,56	22,57	22,69	22,56	22,57	22,69	22,56
C18:0 (ácido octodecanoico)	6,33	6,07	5,87	6,33	6,07	5,87	6,01	6,07	6,18	6,01	6,07	6,18	6,17	7,2	6,24	6,17	6,2	6,24	6,17	6,2	6,24
Total	44,13	43,86	43,62	42,25	43,89	43,55	43,47	43,95	43,98	43,02	43,87	44,05	45,09	43,86	42,02	43,27	42,76	44,29	43,26	43,75	44,17
Ácidos Graxos monoinsaturados																					
C16:1 (delta-9-cis-ácido hexadecenoico)	2,45	2,03	2,48	2,45	2,03	2,48	2,44	2,43	2,44	2,44	2,44	2,44	2,24	2,38	2,44	2,45	2,46	3,24	2,45	2,46	1,98
C18:1n9c (Cis-9-ácido oleico)	30,55	32,23	32,07	29,85	32,32	32,00	29,21	32,45	31,61	28,03	32,25	31,61	26,01	32,03	31,61	31,67	32,75	30,87	31,67	32,75	32,23
C24:1n9 (cis-15-ácido tetracosanoico)	1,13	1,15	1,16	1,12	1,15	1,15	1,12	1,14	1,09	1,11	1,15	1,09	1,09	1,13	1,09	1,11	1,14	1,14	1,07	1,14	1,14
Total	33,31	34,63	34,95	32,61	34,72	34,86	31,98	35,25	34,35	30,79	35,06	34,35	28,55	34,75	34,35	34,48	35,51	34,28	34,44	35,36	34,25
Ácidos graxos polinsaturados																					
C18:2n6c (9-12-ácido octadecadienoico) *	17,55	17,43	17,59	17,55	17,43	17,59	17,54	17,41	17,21	13,98	14,25	14,21	13,27	13,97	13,26	13,27	12,07	12,15	13,27	12,47	11,26
C18:3n3 (9,12,15-ácido octadecatrienoico - ALA)*	1,08	1,83	1,69	1,08	1,96	1,76	1,67	1,71	1,71	1,05	1,78	1,76	1,05	1,95	1,67	1,34	1,95	1,78	0,21	1,45	1,56
C18:3n6 (Ácido α -linolênico)	1,65	1,85	1,28	1,34	1,85	1,28	1,23	1,67	1,16	1,2	1,88	1,13	1,78	1,61	1,07	1,78	1,12	1,02	1,08	1,17	1,01
C20:3n6 (ácido linoleico)	0,55	0,66	0,62	0,54	0,66	0,62	0,06	0,07	0,07	0,06	0,03	0,02	0,04	0,62	0,59	0,04	0,62	0,59	0,04	0,62	0,59
C20:4n6 (ácido araquidônico-ARA)	0,06	0,16	0,14	0,06	0,16	0,14	0,05	0,15	0,14	0,04	0,15	0,14	0,06	0,14	0,14	0,03	0,15	0,15	0,04	0,14	0,14

C20:5n3 (ácido eicosapentaenoico EPA)	0,03	0,7	0,2	0,05	0,7	0,2	0,03	0,4	0,3	0,03	0,5	0,2	0,05	0,4	0,2	0,07	0,7	0,2	0,01	0,5	0,2
C22:6n3 (ácido docosaexaenoico DHA)	0,38	0,38	0,24	0,38	0,38	0,28	0,37	0,37	0,33	0,33	0,36	0,33	0,14	0,35	0,37	0,12	0,35	0,37	0,21	0,25	0,27
Total	20,1	21,08	20,46	19,8	21,21	20,53	20,2	20,12	19,24	18,49	20,17	19,21	20,53	21,56	21,02	20,78	21,15	20,97	19,95	21,13	20,85

*Valores que apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey ao longo do armazenamento.
Tempo: T0 = 0, T1= 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias.

De acordo com a Tabela 10, o conteúdo do ácido graxo C:8 aumentou em até 3,02% a partir de 90 dias. Foi observado ainda, que houve uma redução na concentração de alguns ácidos graxos de cadeia longa como ácido octadecadienoico (6,33%) e ácido octadecatrienoico (ALA) (0,87%). Esse tipo de comportamento foi semelhante ao encontrado na literatura, que relatou um aumento no teor de ácidos graxos C:8 e C:10 em leite humano ordenhado pasteurizado após 60 dias de armazenamento, além da redução na concentração de ácidos graxos de cadeia longa (Ribeiro et al., 2021). Uma explicação para essa observação é que pode ter ocorrido uma quebra nas cadeias dos ácidos graxos presentes no leite humano. Esse fato pode ocorrer devido aos efeitos do processamento, tratamento térmico, resfriamento e congelamento do leite humano.

Os teores dos ácidos graxos octadecadienoico e octadecatrienoico (%) no presente estudo apresentaram redução nas amostras de leite humano ordenhado homogeneizado e pasteurizado a partir do segundo mês de armazenamento. Vale ressaltar que as amostras do grupo controle quando comparadas às homogeneizadas (P.Mixer e U.Sondas) exibiram conteúdo menor desde o primeiro dia de análise (T = 0). Com base na literatura, o perfil de ácidos graxos varia durante a armazenagem, pois é provável que a membrana do glóbulo de gordura fique mais frágil com o passar do tempo. Assim, a degradação das cadeias durante o descongelamento/aquecimento é facilitada (Chen et al., 2020).

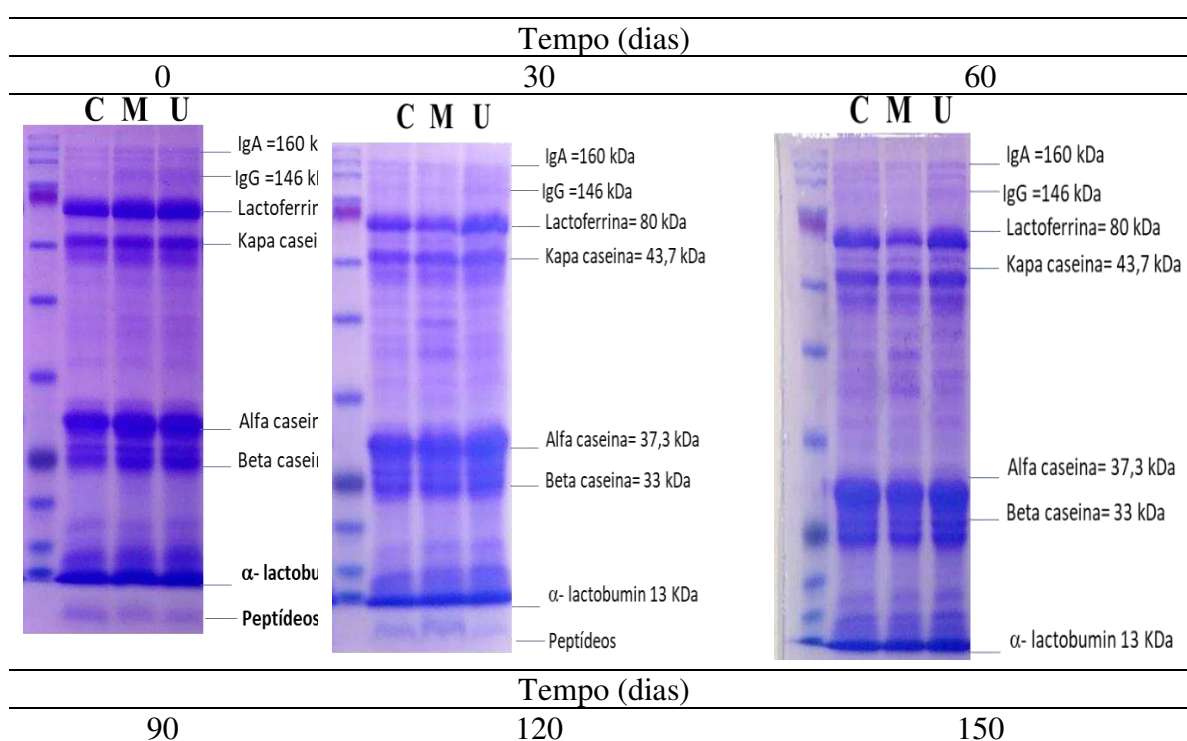
A concentração (%) dos demais ácidos graxos encontrados no LH não foi alterada pelo armazenamento e congelamento ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Destaca-se que o armazenamento sob congelamento não ocasionou a redução da concentração dos ácidos graxos docosaenoico (DHA), nervônico, araquidônico (ARA) e eicosapentaenoico (EPA). Estes ácidos são encontrados no cérebro e contribuem para a execução das funções do sistema nervoso. A literatura relata estabilidade destes ácidos graxos de cadeia longa durante o armazenamento, sendo esta preservação uma possível causa para a alta atividade antioxidante do leite humano (Nessel et al., 2019; Romeu-Nadal et al., 2008).

A concentração dos ácidos graxos é relevante, uma vez que eles participam de diversas atividades neurais, dentre outras (Floris et al., 2019; Schober et al., 2019). Alguns estudos comprovam que a ausência de ácidos graxos (n-3), como o DHA, prejudica o desenvolvimento das atividades do sistema nervoso (Floris et al., 2019; Innis, 1991, 2007). A principal fonte de variação no perfil dos ácidos graxos está associada com a dieta da mãe e com a fase de lactação. A literatura descreve que os ácidos graxos de cadeia longa se originam da dieta materna ou do tecido adiposo e do metabolismo e que os de cadeia curta e média são sintetizados dentro da glândula mamária (Binte Abu Bakar et al., 2021). Ácidos graxos, como o DHA, dependem

quase que inteiramente da ingestão alimentar, uma vez que sua síntese endógena é a partir do ALA. O ALA é um ácido graxo essencial com concentração limitada em mamíferos. Ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oleico, são comumente abundantes no leite humano e estão presentes durante toda a lactação. Assim, deve-se buscar técnicas de processamento e armazenamento para o leite humano ordenhado pasteurizado que mantenha a concentração de ácidos graxos preservada. Busca-se com isso garantir ao lactente um alimento próximo de sua composição original.

6.3.5 Perfil proteico

Os resultados do efeito da homogeneização e do armazenamento (congelamento, descongelamento) do leite humano ordenhado pasteurizado sobre o perfil de proteínas durante 6 meses de armazenamento estão apresentados na Figura 14.



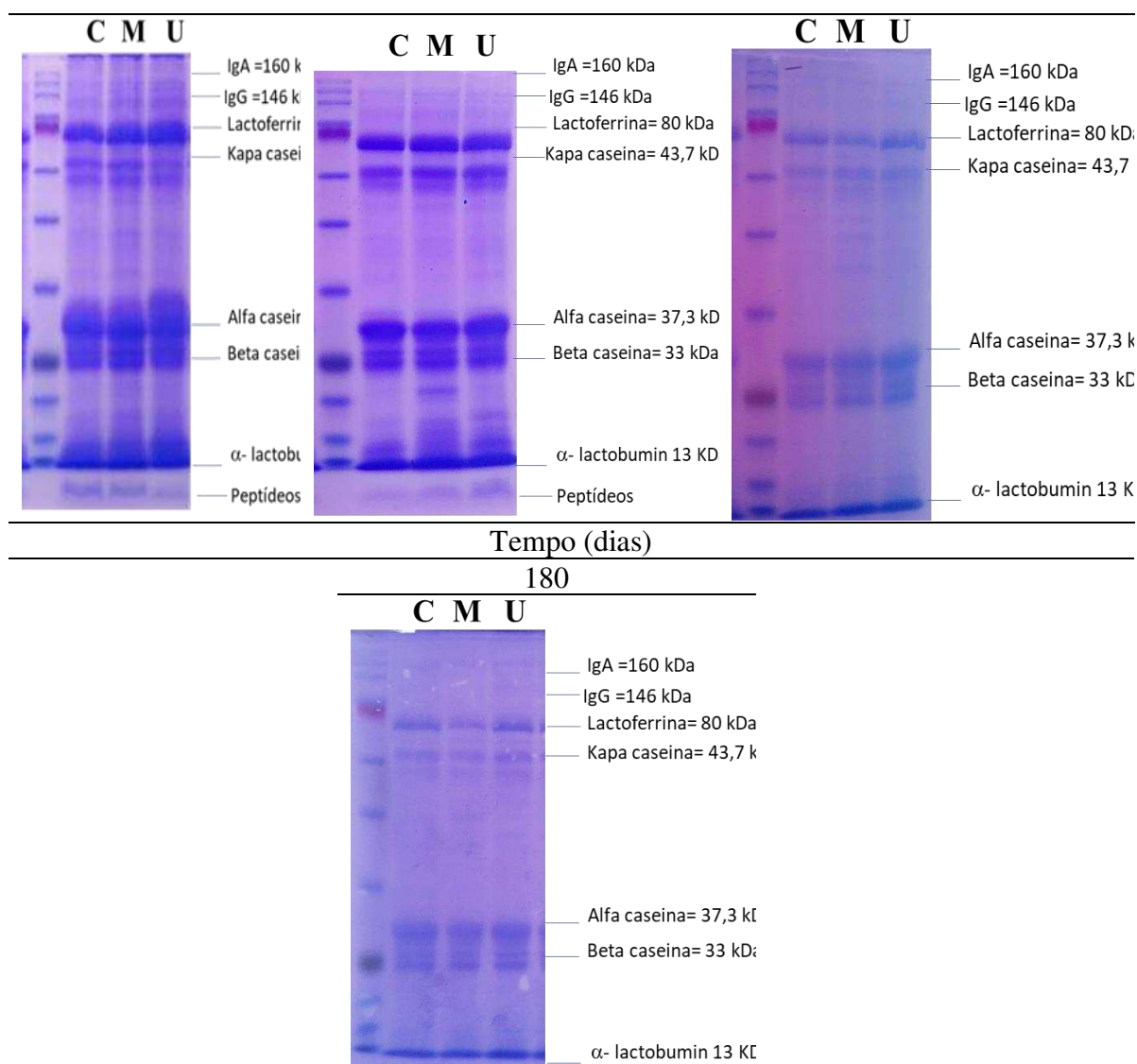


Figura 45: Estudo do perfil eletroforético de proteínas durante o armazenamento durante seis meses para os três tipos de amostras de LH estudados: (C) leite humano pasteurizado, (M) leite homogeneizado por processador *mixer* e pasteurizado e (U) leite humano homogeneizado por ultrassom de sondas e pasteurizado. T0 = 0, T1= 30, T2 = 60, T3 = 90, T4 = 120, T5 = 150 e T6 = 180 dias.

Observa-se na Figura 14 que as bandas de proteínas IgA e IgG são evidentes no gel de eletroforese até 120 dias de armazenamento. Essas proteínas são conhecidas por atuarem no sistema imunológico (Wada & Lönnerdal, 2014). Normalmente, o estudo destas proteínas é correlacionado com o efeito do tratamento térmico, pois é relatado que a pasteurização afeta as proteínas bioativas, ou seja, pode ocorrer hidrólise da cadeia proteica devido a exposição à temperatura de 62,5 °C/ 30 min (Marinković et al., 2016; Piemontese et al., 2019).

A intensidade das bandas da proteína α -lactalbumina reduziu ao longo do armazenamento, corroborando os achados de Lönnerdal *et al.* (2017), que também avaliaram o perfil proteico do leite humano ordenhado e pasteurizado após armazenamento, congelamento e descongelamento. Os autores verificaram que as concentrações de α -lactalbumina diminuem após 30 dias de armazenamento, chegando a uma redução de concentração de até 21% após 12 meses (Lönnerdal, 2017). A alfa-lactoalbumina representa aproximadamente 15% da composição proteica do LH, contém peptídeos que aumentam a absorção de ferro e zinco (Kelleher *et al.*, 2003) e, quando digerida, também fornece aminoácidos essenciais (Lönnerdal, 2017).

A lactoferrina, a kappa-caseína, a alfa-caseína e a beta-caseína não apresentaram alteração nas bandas para as diferentes amostras analisadas durante os seis meses de armazenamento. Logo, pode ser inferido que a homogeneização não afetou o perfil dessas proteínas no leite humano.

6.4. Conclusão

Os tratamentos de homogeneização afetaram benéficamente as características do leite humano ordenhado no decorrer dos seis meses de armazenamento. O leite humano ordenhado homogeneizado e pasteurizado apresentou a menor retenção de gordura após o escoamento pelas sondas de alimentação além de menor diâmetro médio dos glóbulos de gordura, quando comparado ao leite humano processado não homogeneizado, aquele que foi somente pasteurizado. Para todos os sistemas (homogeneizado e não homogeneizado), a estabilidade dos glóbulos de gordura diminuiu com o tempo de estocagem devido ao aumento do tamanho deles. Com relação ao perfil de proteínas, observou-se a redução do conteúdo de imunoglobulinas em todos os tratamentos no decorrer dos seis meses de armazenamento. Contudo, as bandas de imunoglobulinas presentes nas amostras homogeneizadas foram mais intensas, indicando um maior teor destas proteínas no leite homogeneizado. Por fim, a homogeneização não alterou o perfil de ácidos graxos. Portanto, o leite humano ordenhado homogeneizado e pasteurizado pode ser considerado um alimento seguro e com maior aporte calórico após o escoamento em sondas de alimentação do que o leite humano ordenhado pasteurizado, podendo ser uma alternativa para a implementação nos bancos de leite humano.

6.5 Referências

- Arslanoglu, S., Boquien, C. Y., King, C., Lamireau, D., Tonetto, P., Barnett, D., Bertino, E., Gaya, A., Gebauer, C., Grovslie, A., Moro, G. E., Weaver, G., Wesolowska, A. M., & Picaud, J. C. (2019). Fortification of human milk for preterm infants: Update and recommendations of the European milk bank association (EMBA) working group on human milk fortification. In *Frontiers in Pediatrics*, 7, p. 76. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00076>
- Binte Abu Bakar, S. Y., Salim, M., Clulow, A. J., Nicholas, K. R., & Boyd, B. J. (2021). Human milk composition and the effects of pasteurisation on the activity of its components. In *Trends in Food Science and Technology*, 111(1), p. 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.055>
- Boyce, C., Watson, M., Lazidis, G., Reeve, S., Dods, K., Simmer, K., & McLeod, G. (2016). Preterm human milk composition: A systematic literature review. In *British Journal of Nutrition*, 116 (6), p. 1033–1045. <https://doi.org/10.1017/S0007114516003007>
- BRASIL. Ministério da Saúde (2008). Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos. In D. R. de Mello (Ed. 1), Organização do Banco de Leite e do Posto de Coleta. Brasília, DF, 2008. <https://doi.org/Brasília.http://www.redeblh.fiocruz.br/media/blhanv2008.pdf>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 05 de setembro de 2006
- Cacho, N. T., Parker, L. A., & Neu, J. (2017). Necrotizing Enterocolitis and Human Milk Feeding: A Systematic Review. *Clinics in Perinatology*, 44(1), p. 49–67. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.009>
- Chen, Y. J., Zhou, X. H., Han, B., Li, S. M., Xu, T., Yi, H. X., Liu, P., Zhang, L. W., Li, Y. Y., Jiang, S. L., Pan, J. C., Ma, C. H., & Wang, B. C. (2020). Composition analysis of fatty acids and stereo-distribution of triglycerides in human milk from three regions of China. *Food Research International*, 133(7), p. 109196. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109196>
- Correa, K. de P., da Silva, M. E. T., Ribeiro, O. A. S., da Matta, S. L. P., Peluzio, M. do C. G., Basílio de Oliveira, E., & Coimbra, J. S. dos R. (2021). Homogenized and pasteurized human milk: lipid profile and effect as a supplement in the enteral diet of Wistar rats. *British Journal of Nutrition*, p. 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0007114521001380>
- Cristofalo, E. A., Schanler, R. J., Blanco, C. L., Sullivan, S., Trawoeger, R., Kiechl-Kohlendorfer, U., Dudell, G., Rechtman, D. J., Lee, M. L., Lucas, A., & Abrams, S. (2013). Randomized Trial of Exclusive Human Milk versus Preterm Formula Diets in Extremely Premature Infants. *The Journal of Pediatrics*, 163(6), p. 1592-1595.e1. <https://doi.org/10.1016/J.JPEDI.2013.07.011>
- Floris, L. M., Stahl, B., Abrahamse-Berkeveld, M., & Teller, I. C. (2019). Human milk fatty acid profile across lactational stages after term and preterm delivery: A pooled data analysis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 156 (5), p. 102023. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.102023>
- Gallier, S., Vocking, K., Post, J. A., Van De Heijning, B., Acton, D., Van Der Beek, E. M., & Van Baalen, T. (2015). A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136 (2), p. 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.024>
- García, L. N. R., Vieco, D. E., De la Cruz-Bértolo, J., Lora-Pablos, D., Velasco, N. U., & Pallás-Alonso, C. R. (2013). Effect of Holder Pasteurization and Frozen Storage on Macronutrients and Energy Content of Breast Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology*

- and *Nutrition*, 57(3), p. 377–382. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31829d4f82>
- Goldfarb, M. F., Savadove, M. S., & Inman, J. A. (1989). Two-dimensional electrophoretic analysis of human milk proteins. *ELECTROPHORESIS*, 10(1), p. 67–70. <https://doi.org/10.1002/elps.1150100117>
- Innis, S. M. (1991). Essential fatty acids in growth and development. In *Progress in Lipid Research*, 30 (1), p. 39–103. Pergamon. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(91\)90006-Q](https://doi.org/10.1016/0163-7827(91)90006-Q)
- Innis, S. M. (2007). Dietary (n-3) Fatty Acids and Brain Development. *The Journal of Nutrition Recent Advances in Nutritional Sciences*, 137, p. 855–859. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0163-7827\(91\)90006-Q](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0163-7827(91)90006-Q)
- Kelleher, S. L., Chatterton, D., Nielsen, K., & Lönnerdal, B. (2003). Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), p. 1261–1268. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1261>
- Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chemistry*, 141(2), p. 975–984. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>
- Lin, H., Li, S., Xu, C., Pang, M., & Wang, S. (2018). Simultaneous determination of galactose, glucose, lactose and galactooligosaccharides in galactooligosaccharides raw materials by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Food Chemistry*, 263, p. 29–36. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.04.092>
- Liu, H., Zhang, J., Wang, H., Chen, Q., & Kong, B. (2021). High-intensity ultrasound improves the physical stability of myofibrillar protein emulsion at low ionic strength by destroying and suppressing myosin molecular assembly. *Ultrasonics Sonochemistry*, 74, p.105554. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105554>
- Lönnerdal, B. (2017). Bioactive Proteins in Human Milk—Potential Benefits for Preterm Infants. In *Clinics in Perinatology*, 44 (1), p. 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.013>
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N., & Robert, B. (2011). Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry*, 125(2), p. 355–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.005>
- Lopez, C., Madec, M.-N., & Jimenez-Flores, R. (2010). Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chemistry*, 120(1), p. 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.065>
- Marinković, V., Ranković-Janevski, M., Spasić, S., Nikolić-Kokić, A., Lugonja, N., Djurović, D., Miletić, S., Vrvic, M. M., & Spasojević, I. (2016). Antioxidative activity of colostrum and human milk: Effects of pasteurization and storage. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 62(6), p. 901–906. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001090>
- McClements, D. J. (2005). *Food Emulsion: Principles, Practices, and Techniques* (C. PRESS (ed.); 2nd ed.).
- McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, p. 3–26. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.03.002>
- Michalski, M.-C., Lopez, C., Leconte, N., Briard, V., Soares, A. F., Geloën, A., Michalski, M.-C., Soares, A. F., Lopez, C., Leconte, N., Briard, V., & Geloën, A. (2006). The supramolecular structure of milk fat influences plasma triacylglycerols and fatty acid

- profile in the rat. *Eur J Nutr European Journal of Nutrition*, 45(4), p. 215–224. <https://doi.org/10.1007/s00394-006-0588-9>
- Mizuno, K., Nishida, Y., Taki, M., Murase, M., Mukai, Y., Itabashi, K., Debari, K., & Iiyama, A. (2009). Is increased fat content of hindmilk due to the size or the number of milk fat globules? *International Breastfeeding Journal*, 4(7), p.1-6. <https://doi.org/10.1186/1746-4358-4-7>
- Mosca, F., & Gianni, M. L. (2017). Human milk: composition and health benefits. In *La Pediatria medica e chirurgica: Medical and surgical pediatrics*, 39 (2), p. 155. <https://doi.org/10.4081/PMC.2017.155>
- Nessel, I., Khashu, M., & Dyllal, S. C. (2019). The effects of storage conditions on long-chain polyunsaturated fatty acids, lipid mediators, and antioxidants in donor human milk — A review. In *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 149, p. 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.07.009>
- Piemontese, P., Mallardi, D., Liotto, N., Tabasso, C., Menis, C., Perrone, M., Roggero, P., & Mosca, F. (2019). Macronutrient content of pooled donor human milk before and after Holder pasteurization. *BMC Pediatrics*, 19(1), p.1–5. <https://doi.org/10.1186/s12887-019-1427-5>
- Qi, P. X., Ren, D., Xiao, Y., & Tomasula, P. M. (2015). Effect of homogenization and pasteurization on the structure and stability of whey protein in milk. *Journal of Dairy Science*, 98(5), p. 2884–2897. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8920>
- Ribeiro, O. A. S., Correa, K. P., Leite, M. O., Martins, M. A., & Coimbra, J. S. R. (2021). Fatty acid profile of non-conforming pooled human milk as affected by the processing and storage conditions. *International Journal of Research -Granthaalayah*, 9(2), p. 46–54. <https://doi.org/10.29121/granthaalayah.v9.i2.2021.3276>
- Romeu-Nadal, M., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2008). Effect of cold storage on vitamins C and E and fatty acids in human milk. *Food Chemistry*, 106(1), p. 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.046>
- Schober, M. E., Requena, D. F., Maschek, J. A., Cox, J., Parra, L., & Lolofie, A. (2019). Effects of controlled cortical impact and docosahexaenoic acid on rat pup fatty acid profiles. *Behavioural Brain Research*, 378, p.112295. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112295>
- Scudino, H., Silva, E. K., Gomes, A., Guimarães, J. T., Cunha, R. L., Sant’Ana, A. S., Meireles, M. A. A., & Cruz, A. G. (2020). Ultrasound stabilization of raw milk: Microbial and enzymatic inactivation, physicochemical properties and kinetic stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67 (1), p. 105185. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105185>
- Sullivan, S., Schanler, R. J., Kim, J. H., Patel, A. L., Trawöger, R., Kiechl-Kohlendorfer, U., Chan, G. M., Blanco, C. L., Abrams, S., Cotten, C. M., Laroia, N., Ehrenkranz, R. A., Dudell, G., Cristofalo, E. A., Meier, P., Lee, M. L., Rechtman, D. J., & Lucas, A. (2010). An Exclusively Human Milk-Based Diet Is Associated with a Lower Rate of Necrotizing Enterocolitis than a Diet of Human Milk and Bovine Milk-Based Products. *The Journal of Pediatrics*, 156(4), p. 562-567.e1. <https://doi.org/10.1016/J.JPEDI.2009.10.040>
- Wada, Y., & Lönnerdal, B. (2014). Bioactive peptides derived from human milk proteins - mechanisms of action. In *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25 (5), p. 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.012>
- Yao, Y., Zhao, G., Zou, X., Huang, L., & Wang, X. (2015). Microstructural and lipid composition changes in milk fat globules during milk powder manufacture. *RSC Adv.*, 5(77), p. 62638–62646. <https://doi.org/10.1039/C5RA08247A>

7. HOMOGENIZED AND PASTEURIZED HUMAN MILK: LIPID PROFILE AND EFFECT AS A SUPPLEMENT IN THE ENTERAL DIET OF WISTAR RATS

Artigo publicado no periódico *British Journal of Nutrition* (2021)

DOI: 10.1017/S0007114521001380

Abstract

The retention of human milk fat in nasogastric probes of infusion pumps can be observed during the feed of infants unable to suck at the mother's breast. The lack of homogenization of human milk could contribute to the fat holding. Therefore, the present study evaluated (i) the influence of homogenization on milk fat retaining in infant feeding probes and (ii) the *in vivo* effect of the homogenization on lipid absorption by Wistar rats. The animals were fed with human milk treated following two processing conditions, i.e., pasteurized and homogenized-pasteurized. The animals were randomly subdivided into four experimental groups: water-fed (control), pasteurized milk, homogenized-pasteurized milk, and pasteurized-skimmed milk. The results of food consumption, mass body gain, corporate metrics, and plasma blood levels of total cholesterol did not show any difference ($p < 0.05$) among the three types of human milk used in the experiments. The liver, intestine, and intra-abdominal adipose tissue of the four groups of animals presented normal and healthy histology. The composition of fatty acids in the brain tissue of animals fed with homogenized human milk increased when compared with the groups fed with non-homogenized human milk. These values were 11.08% higher for arachidonic acids, 6.59% for docosahexaenoic, and 47.92% for nervous acids. The ingestion of homogenized human milk promoted higher absorption of milk nutrients. Therefore, the addition of the homogenization stage in human milk processing could be an alternative to reduce fat retention in probes and to improve the lipids' absorption in the body.

Keywords: fatty acids, homogenization, human milk bank, infusion pump.

7.1 Introduction

Human milk is a food base for newborns, its proximate composition (water, fat, protein, carbohydrates, and minerals) is balanced and contains unique substances, such as growth factors, antimicrobial factors, anti-inflammatory agents, digestive enzymes, microorganisms, and various types of hormones (Taylor, 2019). Some circumstances can hinder babies from accessing human milk, such as premature births, difficulties suck milk, mothers with an infectious disease, or low milk production volume. In many cases, the non-use of human milk can drive malnutrition in the newborn, impair the development of different parts of the organism, and, in later phases of life, led to the development of chronic diseases, immune deficiencies, obesity, attention deficit, diabetes, and hypertension (Cunnane et al., 2000; Victora et al., 2008).

Rats fed with human milk showed decreased lipid accumulation in skeletal muscle and inflammation status, improved insulin resistance and glucose disposal, and redox status increment. The literature also reports the influence of human milk's lipid profile on rat brain tissues (Aidoud et al., 2018; Cavaliere et al., 2018). It has been reported that sphingomyelin lipids (which contain high amounts of C16:1, C18:1n11, and long-chain fatty acids) were significantly higher in the brain tissues of recently weaned rats fed with human milk or infant formula (Su et al., 2019). Hahn-Holbrook et al. (2019) observed decreased sadness and distress in babies after human milk intake, attributed to its high concentration of n-3 PUFAs. The authors also linked human milk cholesterol to brain maturation (Hahn-Holbrook et al., 2019).

Moreover, according to Isaacs et al. (2010), human milk consumption affects white matter and cognition by increasing glial myelination (Isaacs et al., 2010). Therefore, ensuring the intake of human milk by babies who have previously mentioned difficulties is a challenge to overcome. Human milk banks were created to contribute with alternatives to make it possible for babies to ingest milk, and they are responsible for actions aiming to promote, to protect, and to support breastfeeding and for carrying out activities from a collection of nutritional tactics, selection, classification, use, quality control, and human milk distribution (Brasil, 2008). However, in neonatal intensive care units, fat retention in nasogastric tubes is observed during newborns' feeding by infusion pumps (Stocks et al., 1985). Hence, actions must be adopted to minimize fat retention and deliver the food full-calorie load to newborns.

In this context, homogenization is a unit operation incorporated in human milk processing to modify the milk flow characteristic and diminish fat retention in the tubes. Homogenization can decrease the fat globules' size, contributing to increased human milk

stability and easing its flow (Claire & Thomaz, 1999; García-lara et al., 2014). Hence, milk homogenization is expected to promote a reduction in holding nutrients in probes. Consequently, the newborns can absorb a higher fraction of the calories present in milk ingested. Homogenization (*a*) supplies energy to the milk system, (*b*) promotes the fat globule's rupture, (*c*) reduces the fat globules' average size, and (*d*) contributes to increasing the system's configurational entropy. This increase in configurational entropy slows down the phenomenon of coalescence. Variations in Gibbs energy in a system indicate the most likely state thermodynamically. The phenomenon occurs even though the conversion is kinetically very slow (McClements, 2005). The shear rate during milk homogenization favors the rupture of the fat globule membrane. Thus, many droplets are formed at both a smaller average diameter and a higher number than the native ones, leading to an increase in the total interfacial area. Proteins with surfactant properties diffuse to the interface since the number of phospholipids naturally present in the fat globule interfaces is insufficient to cover the new expanded interfacial area. The interfacial tension reduces, and the colloidal system tends to achieve some kinetic stability (McClements, 2005). The coalescence effect can be avoided if (*i*) the energy supplied to the system is enough to overcome the interaction force between the droplets, (*ii*) there is enough surfactant to reduce the Gibbs-Marangoni effects (McClements, 2005).

Thereby, the homogenization may be connected to the ingestion of an improved range of nutrients and can influence different metabolic processes in the newborn's body. The *in vivo* study can also identify the effects of homogenized human milk consumption on the newborn's metabolism and demonstrate the homogenization stage's safety in human milk processing (Correa, 2017; Rayol et al., 1993). Therefore, in the present work, human milk was used as a supplement in the diet of male Wistar rats to determine: (*i*) the body gain and weight metrics of animals, (*ii*) the influence of the homogenized human milk intake on the biochemical profile of the animal blood, (*iii*) the lipid profile of long-chain fatty acids in the animal brain; (*iv*) the effect of the ingestion of homogenized human milk on the morphofunctional aspects of the liver, intestine, and adipose tissue of animals. This work is relevant because it highlights the addition of the homogenization stage in human milk processing and its influence on Wistar rats' nutrition.

7.2 Methods

Ethical statement

The experiment with rats followed the European Union Regulation on the Care and Use of Laboratory Animals (OJ L 358; 18.12.1986) and its associated guidelines, the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, and the National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). The procedure was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brazil), according to protocol number 66/2018.

Obtaining, processing, and characterization of pooled human milk

Pooled human milk used in the experiments was characterized and classified according to the criteria of the Brazilian National Network of Human Milk Banks (HMB) at the São Sebastião hospital (Viçosa, MG, Brazil). All the material was stored in glass bottles, according to Brazilian regulation (Brasil, 2008). Human milk from the three stages of lactation, i.e., colostrum, transition milk, and mature milk, was used at appropriate microbiological conditions. Samples containing only hair or skin were considered unsuitable for processing in the HMB and, hence, discarded. Such milk was then donated to be used in our experiments. Thus, all donated milk was mixed to form pooled crude human milk, filtered (Whatman 1-125 mm qualitative paper, 45 μm), and fractionated in 3 portions of 1 L each. The schematic diagrams of the processing lines of pooled crude human milk are presented in Figure 15.

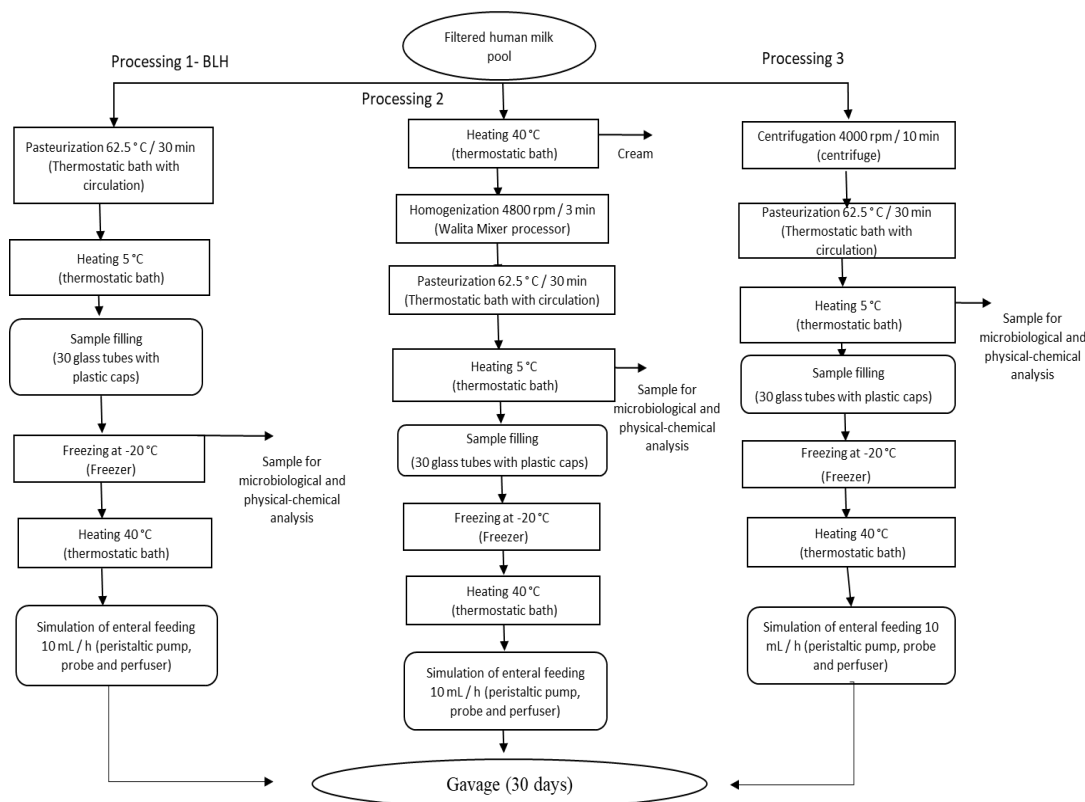


Figure 46: Human milk (HM) processing flowchart. Process 1: HM processed according to the Human Milk Bank (HMB). Process 2: HMB processing added of the homogenization step. Process 3: Skimmed human milk processing.

Processing line 1 represents the pasteurized human milk (PHM) production following the standard process adopted in the Brazilian banks of human milk (Brasil, 2008). Line 2 corresponds to the processing of pasteurized and homogenized human milk (PHHM), in which pasteurized milk was homogenized by using a mixing processor (Walita, Brazil) at 4800 rpm for 3 min. In processing 3 (pasteurized and skimmed human milk, PSHM), human milk was centrifuged at two cycles of 13.000g for 10 min., next pasteurized, and then used as the negative control to evaluate the effect of fat in milk processing.

After each processing, each type of produced pooled human milk was characterized in terms of pH, titratable acidity, protein content (Kjeldahl method), fat content (Gerber method), total dry extract, fixed mineral residue, and total coliforms (AOAC, 2019). The proximate composition of each type of human milk was determined before and after milk flowing through the prototype used for animal feeding. Such a prototype simulates a unit of the neonatal enteral feeding.

The prototype used for animal feeding: The prototype, similar to the devices used in neonatal units for enteral feeding of babies, was utilized to evaluate fat retention inside the nasogastric tubes. One consists of an infusion pump (B. Braun Meinsungen AG, Germany), a perfuser, and a 100 cm probe polyvinyl chloride (Mark Med®, Brazil). The flow rate of milk was 10 mL/h.

Animals, housing, and husbandry

Thirty-two male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) with 21 days of age were used. The animals came from the Central Vivarium of the Center for Biological and Health Sciences/Universidade Federal de Viçosa and were accommodated in individual cages. The rats were placed in a room maintained at 22 ± 1 °C and a light-dark cycle of 12 h for 30 days.

Study design

The 32 animals were randomly schematized into 4 groups ($n = 8$ / group), composed of two control and two test groups. The animals received, daily, via gavage: water (control group); pasteurized-skimmed human milk, PSHM (negative control group); homogenized-pasteurized human milk, PHHM (test1 group); and pasteurized human milk, PHM (test2 group). All groups were given access to commercial diets and water *ad libitum* during the 30 days of the experiment.

Experimental procedures

The weekly volume of human milk (HM) offered to the rats for the weight gain was within the recommended amount range between 1 and 2 mL/100 g of body mass ⁽¹⁸⁾ to avoid animal stress or discomfort. Consequently, the group's average body mass with the lowest average weight (weekly) was used to calculate HM's volume to be administered in the following weekly. The volumes of each HM type offered by gavage were 0.86 mL (week 1), 1.3 mL (week 2), 1.6 mL (week 3), and 2 mL (week 4), totaling 43 mL/rat/30 days.

Sample size

The Student's t-test was used to calculate the number of repetitions. No previous experiment was performed to calculate the ideal number of repetitions. Thus, Dias et al. (2018) procedure to estimate the variance and minimum difference between means was used. These authors assessed the effectiveness of food consumption from different lipid sources, calculated as the ratio between weight gain and total food consumed. The number of 8.07 repetitions was determined using 4 treatments, at a significance level of 5%. Such a number was close to that suggested for 8 repetitions. Thus, for our experiment, 32 animals were requested. That is a total of 8 repetitions per treatment. Appendix 1 shows the calculation of the ideal number of repetitions.

Experimental Outcomes

Body weight: The animals' body weight was recorded before the first dose (Day 1) and twice a week until the end of the study. Food consumption was measured weekly. The resulting data were used to calculate the feed efficiency ratio (FER), defined as the relationship between animal weight gain and dietary intake:

$$FER = \frac{\text{weight gain} \left(\frac{g}{g}\right)}{\text{diet consumption} \left(\frac{g}{g}\right)} \quad (7)$$

Body metrics (abdominal and thoracic perimeters) were determined at the beginning and the end of the diet. The difference between the body metric values at the beginning and the end of the experimental period was calculated. The (abdominal perimeter)/(thoracic perimeter) ratio was used to calculate the body mass index (BMI) and Lee's index.

$$BMI = \frac{\text{body mass}}{(\text{muzzle length}-\text{anus})^2} \left(\frac{g}{cm^2}\right) \quad (8)$$

$$\text{Lee Index} = \frac{\sqrt[3]{\text{body mass}}}{(\text{muzzle length}-\text{anus})} \left(\frac{g}{cm}\right) \quad (9)$$

Biochemical analyzes: At the experiment end (30 days), the animals were fasted (12 h) and submitted to euthanasia by cardiac puncture after anesthesia with 100% isoflurane (Isoforine, Cristália®, Brazil). The blood was collected in heparinized tubes (13 × 100 mm; BD Vacutainer®, USA) and centrifuged (Fanem-204, SP, Brazil) under refrigeration (4 °C) for 10 min at 1006g to obtain plasma. The plasma was separated and stored at -80 °C for biochemical analyzes. Total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL-cholesterol), triglycerides, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) were determined using commercial kits (Bioclin®, Brazil) and a spectrophotometer (Mindray Medical International Limited, model BS 200, China) (Folch et al., 1956).

Assessment of liver tissue: Hepatic lipids were extracted using organic solvents (Rosa et al., 2016), and its content was determined by a colorimetric method in a microplate spectrophotometer (Multiskan Sky, Thermo Fisher Scientific, USA) (Silva et al., 2020).

Profile of unsaturated and saturated fatty acids in rat brain tissues: The brain's total lipid content was converted to fatty acid methyl esters to obtain its fatty acid profile. This analysis was carried out in a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID) (Shimadzu, GC-2010, Japan) (Dias et al., 2018).

Histological analysis and microtomography of the femur: Histological analysis: Fragments of the liver and small intestine of the animals were removed and fixed, for 24 h, in Carson's formalin at room temperature. After fixation, the tissues were dehydrated in solutions of an increasing gradient of ethanol (70% to absolute alcohol) and then included in hydroxymethyl methacrylate resin (Historesin, Leica®, USA). Cross-sectional and longitudinal sections of 3 µm thickness were obtained using a rotating microtome (RM2155, Leica®, USA) and next stained in hematoxylin-eosin (HE) solution. Images were captured with a 20X objective under a light microscope (Primo Star 2012, Zeiss®, Germany) using an Aixo ERc5s video camera (Zeiss®, Germany) to carry out the morphometric analysis of the liver and small intestine. For the small intestine, the villus height and width (apical, middle, and basal region), and depth of the Lieberkühn crypts were measured with the aid of the Image J® software version 4.5 (Media Cybernetics) (Aljewicz et al., 2018).

The fragments of abdominal adipose tissue were dehydrated, embedded in paraffin (Paraplast Plus, Sigma®, Switzerland), cut to 5 µm thickness, and stained with hematoxylin and eosin (HE). The lamina was assembled with the aid of Entellan (Merck®, Germany). Ten fields per animal were captured to measure adipocytes' area, directly from the light microscope (Primo Star 2012, Zeiss®, Germany) with a 20X objective (Folch et al., 1956). The average values obtained from the intestine and adipose tissue were analyzed by the Tukey test at the level of 5% probability. Microstructural characterization was made using a SkyScan high-resolution X-ray microtomography (model 1174v2). The measurements obtained were trabecular volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb/Th), number of trabeculae (Tb·N), and thickening between trabeculae (Tb·Sp) (Rayyan et al., 2015).

Statistical analyses

The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine the data normality. After confirming normality, the data were subjected to the analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test at 5% probability ($p < 0.05$). The analyzes were performed by using the SAS statistical software, version 9.2.

7.3 Results and discussion

Human milk characterization

Table 10 shows the average composition of the 3 types of processed pooled human milk (PSHM, PHM, and PHHM) before and after flowing through the prototype probes.

Table 10: Composition (mean \pm SD) and process conditions of human milk (pooled crude; PHM, pasteurized; PHHM, pasteurized-homogenized; PSHM, pasteurized-skimmed) before and after flowing through the probes of the infusion pump prototype.

Content (%)	Human milk						
	Pooled crude HM	PHM		PHHM		PSHM	
		Before flowing	After flowing	Before flowing	After flowing	Before flowing	After flowing
Lipid	3.15 \pm 0.13 ^a	3.13 \pm 0.15 ^a	1.52 \pm 0.18 ^b	3.14 \pm 0.14 ^a	3.14 \pm 0.18 ^a	0.30 \pm 0.08 ^c	0.23 \pm 0.12 ^c
Protein	2.04 \pm 0.12 ^a	2.04 \pm 0.13 ^a	1.95 \pm 0.19 ^a	2.04 \pm 0.11 ^a	2.04 \pm 0.12 ^a	2.05 \pm 0.12 ^a	2.00 \pm 0.15 ^a
Carbohydrate	6.38 \pm 0.20 ^a	6.37 \pm 0.23 ^a	5.90 \pm 0.32 ^b	6.29 \pm 0.38 ^a	6.25 \pm 0.31 ^a	6.37 \pm 0.15 ^a	5.61 \pm 0.20 ^b
/	/	/	/	/	/	/	/
Lactose	5.79 \pm 0.13 ^a	5.77 \pm 0.23 ^a	5.76 \pm 0.19 ^a	5.79 \pm 0.11 ^a	5.78 \pm 0.12 ^a	5.77 \pm 0.13 ^a	5.46 \pm 0.10 ^b
Minerals	0.26 \pm 0.01 ^a	0.24 \pm 0.01 ^a	0.17 \pm 0.01 ^a	0.24 \pm 0.01 ^a	0.24 \pm 0.01 ^a	0.18 \pm 0.01 ^a	0.17 \pm 0.01 ^a
Total dry extract	11.96 \pm 0.33 ^a	11.76 \pm 0.23 ^a	9.71 \pm 0.22 ^b	11.72 \pm 0.24 ^a	11.53 \pm 0.17 ^a	8.9 \pm 0.30 ^a	7.91 \pm 0.29 ^b
Process condition							
Acidity (% lactic acid)	0.50 \pm 0.04 ^a	0.51 \pm 0.02 ^a	0.51 \pm 0.02 ^a	0.51 \pm 0.01 ^a	0.52 \pm 0.03 ^a	0.50 \pm 0.04 ^a	0.50 \pm 0.03 ^a
pH	6.95 \pm 0.02 ^a	6.96 \pm 0.03 ^a	6.96 \pm 0.02 ^b	6.96 \pm 0.01 ^a	6.96 \pm 0.01 ^a	6.96 \pm 0.00 ^a	6.96 \pm 0.00 ^a

All analyzes were performed in 3 repetitions. 4 experiments/12 samples. Values are expressed as mean \pm SD. Different letters on the same line: statistical difference by the Tukey test ($p < 0.05$).

A decrease in the total dry extract, fat, carbohydrate, and fixed mineral residue after flowing was documented in the pasteurized human milk (PHM). Pasteurized-skimmed human milk (PSHM) exhibited a decrease in the contents of total dry extract and carbohydrates. Pasteurized-homogenized human milk (PHHM) did not show a composition change after flowing through the prototype and presented 3.14% of fat, 2.04% of protein, and 5.79% of lactose. Such contents are similar to those in the pooled crude human milk; therefore, pasteurization and homogenization of human milk did not significantly change the HM composition ($p < 0.05$).

Table 10 reveals the nutrient holding inside the infusion pump probes after PHHM flowing. Fat and some fat-soluble components tend to adhere to the wall of nasogastric tubes during the milk flow through the probe, causing imbalances in the newborn's nutrition. Thus, the addition of the homogenization step in milk processing promoted a reduction in the milk fat globules' diameter, more structural stability, better milk flow, and consequently, the newborn would receive a higher quantity of total solids (García-lara et al., 2014; Milner & Allison, 1999). Milk fat affords essential fatty acids that compose cell membranes' structure, absorb fat-soluble vitamins, and construct hormones (Barreiro et al., 2018; Mehrotra et al., 2019).

Pooled crude human milk was pasteurized at 65 °C/30 min., which is a sufficient process condition to destroy pathogenic microorganisms and reduce the rate of spoilage. The number of coliforms (at 35 °C and 45 °C) in pasteurized human milk was inferior to 3.0 NMP/g within the expected range of the Brazilian regulation criteria (Brasil, 2008). Hence, pasteurized-homogenized human milk would guarantee milk supply with a higher concentration of nutrients at the end of the infusion process. The addition of the homogenization step in the processing line of human milk is also made possible.

Feed intake, body mass, and animal metrics

The impacts of feed intake on weight gain and feed efficiency ratio are shown in Figure 16.

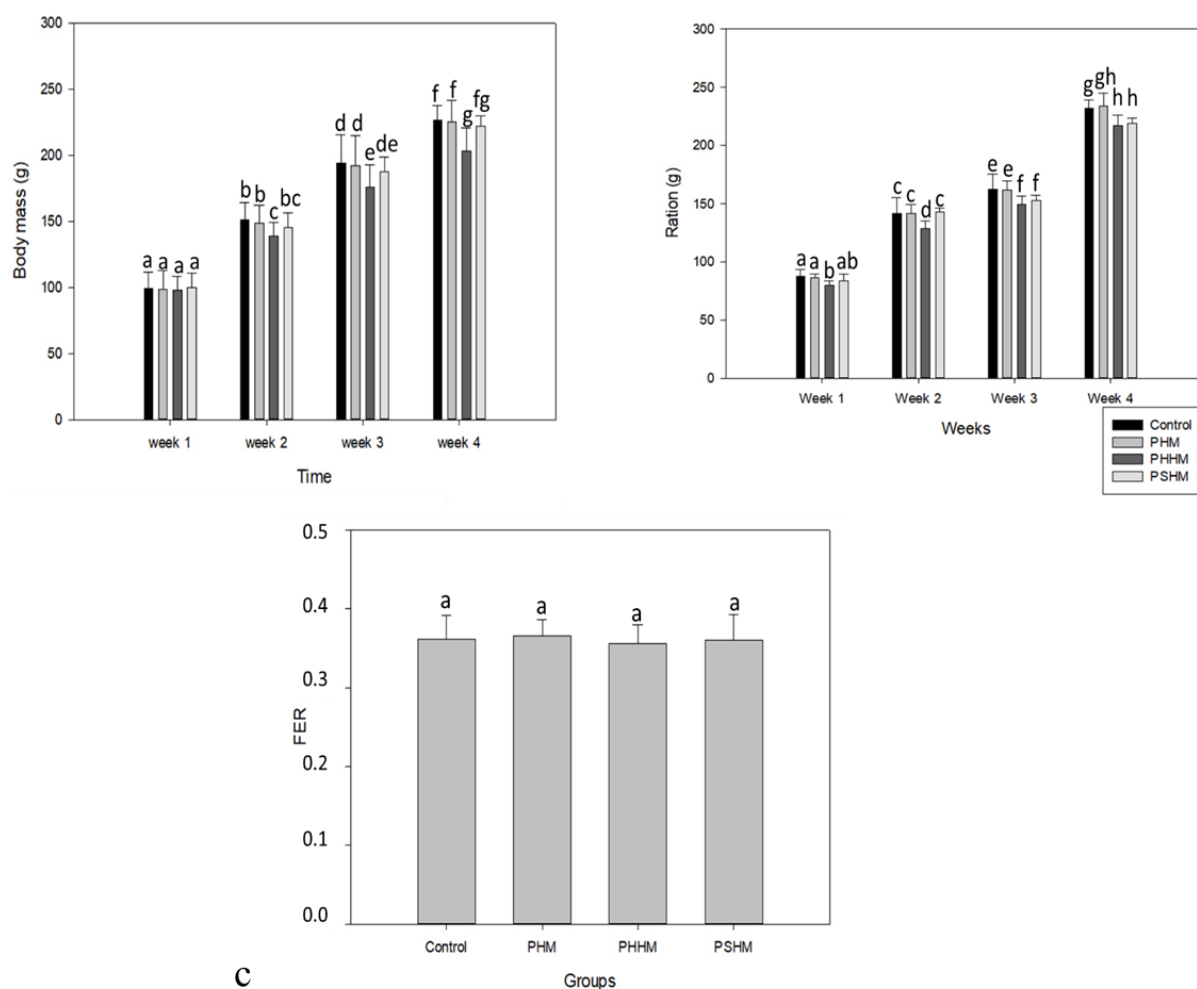


Figure 47:(16a) Rat weight gain according to the following weeks. (16b) Average feed consumption per week. (16c) Feed efficiency ratio (FER). Treatments: PHM, pasteurized human milk; PHHM, pasteurized-homogenized human milk; PSHM, pasteurized-skimmed human milk. **n = 8 animals/group**. Values are expressed as **mean \pm SD**. Bars with the same letters showed no significant difference from the Tukey test ($p < 0.05$).

Since FER is associated with the animal's weight gain and the food consumed, Figure 16a shows the mass body gain during 4 weeks, and Figure 16b the feed intake in 4 weeks. There was observed no significant difference ($p < 0.05$) for the relative weight of the organs and body metrics (Table 11).

Table 11: Average values of body metrics and relative weight of organs.

Parameters	Control	PHM	PHHM	PSHM
Lee's initial index				
	0.33 ± 0.02a	0.32 ± 0.01a	0.33 ± 0.02a	0.32 ± 0.01a
Lee's final Index	0.28 ± 0.01a	0.28 ± 0.01a	0.30 ± 0.01a	0.30 ± 0.01a
Initial abdominal circumference (cm)				
	10.38 ± 3.42a	13.00 ± 0.70a	11.50 ± 0.58a	11.54 ± 0.42a
Final abdominal circumference (cm)				
	17.34 ± 1.32a	15.29 ± 0.83a	15.14 ± 1.03a	16.38 ± 0.79a
Δ Abdominal girth (cm)	6.96 ± 3.80	7.1 ± 0.51	3.64 ± 1.08	4.84 ± 0.79
Initial thoracic perimeter (cm)	10.88 ± 0.99a	11.5 ± 0.50a	11.21 ± 0.49a	11.09 ± 0.55a
Final thoracic perimeter (cm)	15.41 ± 0.91a	15.7 ± 0.85a	14.43 ± 0.93a	14.65 ± 0.73a
Δ Thoracic perimeters (cm)	4.54 ± 1.46a	4.2 ± 0.88a	3.21 ± 0.81a	3.56 ± 0.95a
Liver weight (g)	11.17 ± 1.39a	10.53 ± 1.34a	9.74 ± 0.52a	9.78 ± 1.09a
Brain weight (g)	1.70 ± 0.31a	1.80 ± 0.10a	1.66 ± 0.14a	1.70 ± 0.15a
Large intestine weight (g)	2.81 ± 0.57a	2.98 ± 0.32a	2.93 ± 0.47a	2.70 ± 0.55a
Small intestine weight (g)	10.44 ± 1.31a	9.87 ± 1.47a	9.10 ± 0.40a	9.53 ± 1.00a

Data are presented as means ± SD from n = 8 animals/group: samples with a normal distribution. Different letters on the same line indicate statistical difference (p<0.05) between groups, using the ANOVA test followed by the Tukey test.

The animals supplemented with diets containing homogenized-pasteurized human milk (PHHM) exhibited a weekly lower feed consumption than the other groups (p>0.05). At the last week of the *in vivo* tests, the PHHM group animals showed low weight gain (p>0.05). Despite the lower feed intake, the animals of the PHHM group remained healthy and developed as expected.

Thus, human milk processing may not affect the mass body gain, even if the feed consumption is low because FER did not significantly differ among the groups (Figure 16c). Such behavior may be due to the good digestibility and absorption of milk nutrients, which promoted the animals' mass body gain.

Breast milk is rich in long-chain fatty acids that act, for example, in the human satiety. Thus, the rich composition of human milk in fatty acids (Floris et al., 2019; Havlicekova et al., 2016) can be connected with satiety because some fatty acids help absorb nutrients in the

intestine (Innis et al., 1994). However, the reason is not exact. The sn-2 bond acts in digestion control and subsequent fat absorption. Among the fatty acids of human milk, palmitic acid, for example, represents 20 to 25% of the total fatty acids of human milk. Nearly 70% of palmitic acid composition corresponds to triacylglycerols, which are esterified in the sn-2 position. As palmitic acid absorption slows intestinal motility, the intestine may have time for the occurrence of all reactions, leading the animal to greater satiety (Zhao et al., 2019). Besides, fat globules of homogenized human milk are smaller and, consequently, have a larger surface area. The increase of surface area makes the enzymes' performance and lipids' digestion easy, helping with the absorption (Kelleher et al., 2003).

Regarding a link between satiety and the other nutrients, human milk contains bioactive proteins, helping the intestine's nutrient absorption. The alpha-lactalbumin protein, for example, may increase the absorption of iron and zinc and provide essential amino acids (Ali, 2016; Kang et al., 2015). In a smaller number, phosphorylated peptides may act in the absorption of Ca^{+2} (Wu et al., 2020). Most human milk proteins are absorbed quickly by the body. Breast milk also contains oligosaccharides (HMOs), which (a) favor more excellent absorption of the nutrients ingested (Cacho & Lawrence, 2017); (b) act as prebiotics, promoting beneficial intestinal bacteria's growth and generating short-chain fatty acids, essential for intestinal health (Walsh et al., 2020); (c) modulate the host's epithelial immune responses; and (d) reduce the binding of pathogenic bacteria and viruses selectively to the intestinal epithelium, preventing the onset of diseases that can disrupt the absorption of nutrients by the intestine (Trinchese et al., 2015).

Studies have shown that diets supplemented with human milk decrease the inflammation state of mitochondrial cells (Trinchese et al., 2015), improve glucose elimination and insulin resistance, and reduce lipids accumulation in skeletal muscle (Cavaliere et al., 2018; Lemieux et al., 2001).

In the last week of the *in vivo* experiments, the animals ingested (per gavage) a higher volume (2 mL/day) of human milk than in the three preceding weeks. Thus, diet ingestion increments may have contributed to more excellent absorption of nutrients, bringing satiety since milk had a high-fat content. We cannot rule out the possibility of animal stress because it could result in lower feed consumption.

Biochemical assays

Table 12 shows the effects of human milk process conditions on the rats' biochemical indices (cholesterol, HDL, and triglycerides of animal's blood), referring to the four groups studied (control_b; PHM_b: pasteurized human milk; PHHM_b: pasteurized-homogenized human

milk; and PSHM_b: pasteurized-skimmed human milk). There was no significant difference among groups for cholesterol, HDL, and triglyceride data.

Table 12: Biochemical profile of plasma of Wistar rats fed with water and human milk by gavage. Diet of rat groups: control, water; PHM, pasteurized human milk; PHHM, homogenized-pasteurized human milk; PSHM, skimmed-pasteurized human milk.

%	Groups			
	Control	PHM	PHHM	PSHM
cholesterol	94.4286 ± 7.78	88.00 ± 6.96	92.2 ± 14.24	82 ± 10.75
HDL	33.2857 ± 2.75	30.2857 ± 3.68	35 ± 2.34	29.375 ± 3.85
Triglycerides	64.5714 ± 16.64	56 ± 17.22	51.4 ± 10.84	58.75 ± 30.65

Values are expressed as **mean ± SD**. All analyzes were performed in **8 repetitions/group. 4 treatments/32 samples**. Equal letters on the same line: statistical equality by the Tukey test ($p < 0.05$).

The results observed in Table 12 agree with those found in the literature for Wistar rats at the same age. According to the range cited by Ali et al. (Kang et al., 2015), the values found in our work for total cholesterol (92.20 ± 14.24 mg/dL), HDL (35.00 ± 2.34 mg/dL), and triglycerides (51.40 ± 10.84 mg/dL) are representative of a healthy animal (Kang et al., 2015).

High values of cholesterol and triglyceride indicate a propensity for higher adiposity rates. The study of total cholesterol can predict ischemic heart disease, while triglycerides in high concentrations indicate the risk of cardiovascular disease⁽⁴⁴⁾. The present results indicate no difference in total cholesterol and triglycerides.

Regarding the analyzed enzymes (ALT and AST), there was no significant difference between groups ($p < 0.05$). The average values of ALT (150 U/L) and AST (35 U/L) found in our experiments are in the range reported for a healthy animal (R. Y. Wu et al., 2020).

The values of total lipids, cholesterol, and triglycerides showed no difference for the liver ($p < 0.05$). Thus, the biochemical assay results allowed us to infer that the rat's diet supplemented with human milk kept the biochemical variables in the normal ranges.

Fatty acid profile of human milk

Table 13 shows the fatty acid profile of studied human milk (PSHM, PHM, and PHHM) compared with the literature data on fatty acid compositions of human milk.

Table 13: Fatty acid composition (%) of human milk (PHM, pasteurized; PHHM, pasteurized-homogenized; PSHM, pasteurized-skimmed) after flowing through the probes of the infusion pump prototype.

Fatty acid	Human milk			Literature range for HM*
	PHM	PHHM	PSHM	
C8:0 (octanoic acid)	<0.01	0.5 ± 0.32	<0.01	0.25 - 0.29
C12 (dodecanoic acid)	6.06 ± 0.42 ^a	6.22 ± 0.32 ^a	6.57 ± 0.42 ^a	5.98 - 7.46
C16:0 (hexadecanoic acid)	27.56 ± 0.61 ^a	27.38 ± 0.62 ^b	27.33 ± 0.34 ^a	14.06 - 22.6
C18:0 (octodecanoic acid)	8.87 ± 0.22 ^a	9.79 ± 0.42 ^b	8.56 ± 0.22 ^a	5.05 - 6.89
C21:0 (henicosanoic acid)	<0.01	0.40 ± 0.57	<0.01	0.024 - 0.11
C16:1 (delta-9-cis-hexadecenic acid)	2.72 ± 0.09 ^a	3.05 ± 0.15 ^b	2.99 ± 0.02 ^b	1.55 - 2.22
C18:1n9c (Cis-9-octadecenoic acid)	29.10 ± 0.42 ^a	31.67 ± 0.62 ^c	30.50 ± 0.08 ^b	19.73 - 35.3
C24:1n9 (cis-15-tetracosenoic acid)	1.57 ± 0.02 ^a	2.06 ± 0.57	1.67 ± 0.02 ^a	0.03 - 0.27
C18:3n3 (9,12,15-octadecatrienoic acid-ALA)	1.75 ± 0.04 ^a	1.87 ± 0.62 ^b	1,15 ± 0.25 ^a	1.54 -2.22
C22:6n3 (docosahexaenoic acid-DHA)	0.04 ± 0.02 ^a	0.09 ± 0.35 ^b	0.03 ± 0.05 ^a	0.09 - 0.46
C18:2n6c (9-12-octadecadienoic acid)	13.07 ± 0.05 ^a	14.34± 0.06 ^b	10.07 ± 0.06 ^a	14.96 -42.42
C20:4n6 (arachidonic acid-ARA)	0.12 ± 0.15 ^a	1.07 ± 0.06 ^b	<0.01	0.48 - 0.60

Values are expressed as **mean ± SD**. Normal distribution of fatty acids. Different letters on the same line: statistical difference by Tukey test ($p < 0.05$). *(Barreiro et al., 2018; Floris et al., 2019; Nishimura et al., 2013; Yuan et al., 2019)

All fatty acids quantified in the present work exhibited concentrations in the range (García-lara et al., 2014), as shown in Table 13. The higher concentration of C8:0, C16:0, C18:0, C21:0, C16:1, C18:1n9c, C18:3n3; C24:1n9, C22:6n3c, C18:2n6c, and C20:4n6 was verified in pasteurized-homogenized human milk compared with pooled crude human milk. The difference in the concentration of fatty acids among the types of studied milk can probably be due to the fat retention in the probes used to feed the animals (Brouwer-Brolsma et al., 2017; Correa, 2017; Martinez et al., 1987).

Among the fatty acids found in the three types of human milk (García-lara et al., 2014), the essential ones stand out, long-chain precursors linoleic acid and alpha-linolenic (acid ALA)

and the fatty acids long-chain (arachidonic acid, eicosapentaenoic acid-EPA, and docosahexaenoic acid-DHA). Such fatty acids can act in antidepressant and cognitive mechanisms. The absence of some fatty acids (n-3), such as DHA, impairs spatial learning and memory in rodents. Studies have shown that the level of DHA depends almost entirely on food, and the endogenous synthesis of DHA from ALA is limited in mammals (Gopaldas et al., 2019; Medeiros da Silva et al., 2014).

Fatty acid profile of brain tissues of Wistar rats

The fatty acid profile of the animals' brain tissues is shown in Table 14.

Table 14: Profile of fatty acids (%) present in the brain tissue of the rats. PHMc, pasteurized human milk; PHHMc, pasteurized-homogenized human milk; PSHMc, pasteurized-skimmed human milk

Fatty acids	Control - water	Group			Literature range for brain*
		PHMc	PHHMc	PSHMc	
Saturated					
C12 (dodecanoic acid)	0.28 ± 0.62	<0.01	<0.01	<0.01	0.04
C15:0 (pentadecanoic acid)	0.66 ± 0.60 ^a	0.59 ± 0.30 ^a	0.45 ± 0.21 ^a	1.00 ± 0.51 ^b	0.1
C16:0 (hexadecanoic acid)	23.19 ± 1.78 ^b	20.90 ± 0.23 ^a	21.89 ± 3.01 ^b	21.55 ± 1.95 ^b	15.8
C17:0 (heptadecanoic acid)	1.87 ± 0.35 ^a	2.11 ± 0.44 ^b	1.56 ± 0.21 ^a	1.97 ± 0.36 ^a	0.1
C18:0 (octadecanoic acid)	22.31 ± 2.49 ^a	20.89 ± 5.64 ^a	20.43 ± 1.87 ^a	20.36 ± 0.82 ^a	2.3
C20:0 (eicosanoic acid)	0.46 ± 0.64 ^a	<0.01	1.00 ± 0.92 ^c	0.69 ± 0.87 ^a	0.2
C21:0 (hencosanoic acid)	0.51 ± 1.16 ^a	1.57 ± 0.82 ^a	3.41 ± 1.67 ^b	1.90 ± 1.61 ^b	0.89
C24:0 (tetracosanoic acid)	0.85 ± 0.81 ^a	0.42 ± 0.57 ^a	0.41 ± 0.93 ^a	0.30 ± 0.01 ^a	0.6
Monounsaturated					
C17:1 (Cis-10- heptadecanoic acid)	0.56 ± 0.25 ^a	0.25 ± 0.55 ^a	0.55 ± 0.28 ^a	0.52 ± 0.49 ^a	0.3
C18:1n9c (Cis-9- octadecenoic acid)	19.48 ± 2.05 ^a	20.50 ± 3.73 ^a	19.20 ± 2.49 ^a	19.14 ± 0.87 ^a	17.4
C24:1n9 (cis-15- tetracosenoic acid)	0.50 ± 0.70 ^a	0.50 ± 0.70 ^a	0.96 ± 0.15 ^b	0.94 ± 0.15 ^a	0.9
Polyunsaturated					
C20:2 (8,11- eicosadienic acid)	0.21 ± 0.46	<0.01	0.31 ± 0.21	<0.01	<0.01

C22:2 (docosadienic acid)	0.97 ± 0.58 ^b	0.48 ± 0.66 ^a	0.44 ± 0.98 ^a	0.79 ± 0.45 ^b	0.44
n-3 Polyunsaturated					
C18:3n3 (9,12,15-octadecatrienoic acid-ALA)	1.14 ± 0.67 ^a	1.85 ± 0.60 ^a	2.21 ± 1.53 ^a	1.75 ± 0.53 ^a	1.14
C20:5n3 (eicosapentaenoic acid-EPA)	2.20 ± 0.35 ^a	1.93 ± 0.60 ^a	2.76 ± 0.19 ^b	2.32 ± 0.41 ^{ab}	1.63
C22:6n3 (docosahexaenoic acid-DHA)	9.25 ± 1.36 ^a	10.49 ± 0.32 ^a	11.23 ± 0.44 ^b	9.53 ± 1.66 ^a	8.3-9.7
n-6 Polyunsaturated					
C18:2n6c (9-12-octadecadienoic acid)	0.72 ± 1.02 ^a	1.06 ± 1.15 ^b	1.03 ± 0.99 ^b	0.82 ± 0.84 ^a	0.43-0.77
C20:4n6 (arachidonic acid-ARA)	8.46 ± 1.12 ^a	8.51 ± 0.96 ^a	9.57 ± 0.81 ^b	8.88 ± 0.38 ^a	10.12-14.77

Values expressed as (mean ± SD); n = 8 animals/group. Different letters on the same line: statistical difference by Tukey test (p<0.05). *(Hartvigsen et al., 2003; Schober et al., 2019; Su et al., 2019).

There is a difference in the concentration of C20:4n6, C22:6n3, and C24:1n9 (p>0.05) that is higher for the group fed with pasteurized-homogenized human milk. This PHHM group also showed a more significant fraction (%) of DHA and nerve acid over the other groups (p<0.05). All values are within the literature range, reinforcing the contribution of the homogenization stage to the better use of nutrients available in human milk. The PHHM group also exhibited an average concentration of C21:0 fatty acid higher than the values of literature and other evaluated groups'. The influence of corn intake on the concentration of C21:0 fatty acid in bovine milk was already reported (Gerster, 1998).

The reduction in alpha-linolenic fatty acid content can be explained based on its action as a precursor to DHA and EPA found in high concentrations in human milk (Balakrishnan et al., 2019). DHA promotes brain and visual development, reduces cardiovascular morbidity and mortality, fights inflammatory conditions, fights cognitive decline, and helps prevent cancer (Blázquez-Medela et al., 2019).

More significant variations were not observed in the brain's fatty acid profile of animals, probably due to the small volume of human milk in the diet. Despite such a reduced amount of milk, some fatty acids were found in higher concentrations in PHHM than in the other groups.

Histology of liver, adipose tissue, and intestine

The liver's photomicrographs, intra-abdominal adipose tissue, and intestine are shown in Figure 17 and Table 15.

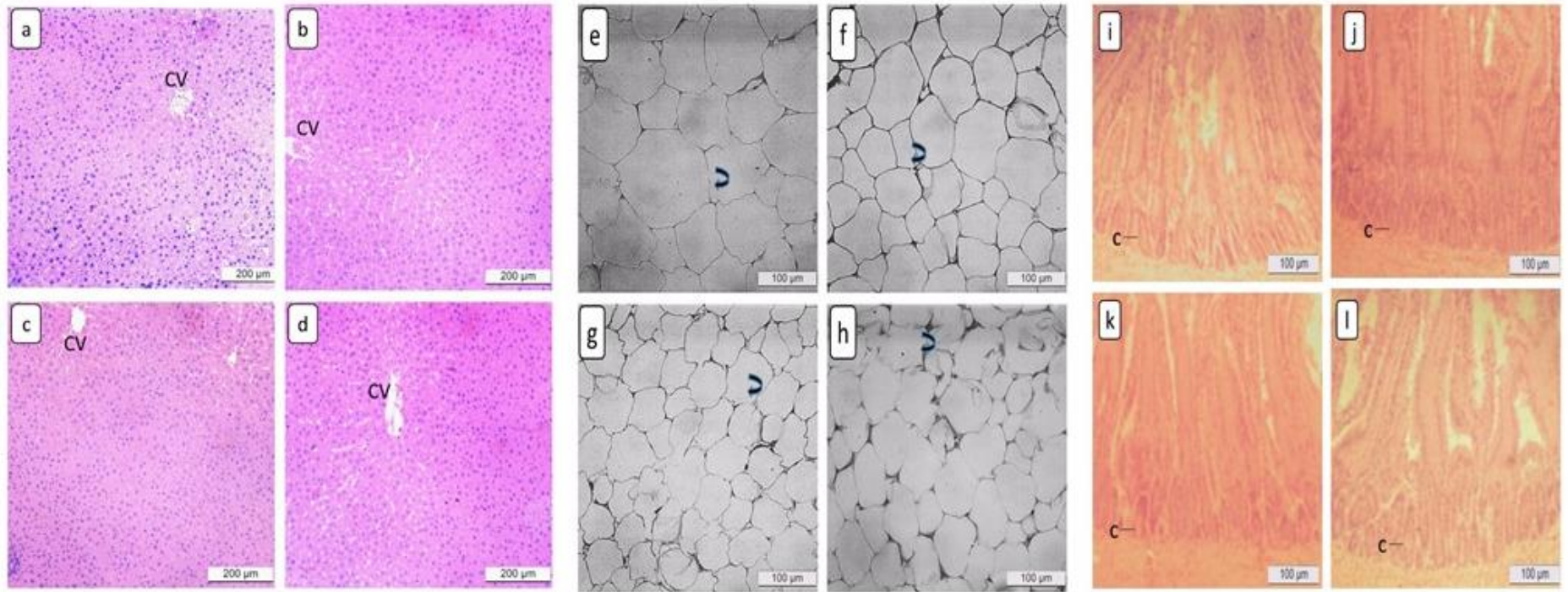


Figure 48: Effect of processed human milk intake on (A1) Liver tissue architecture: (17a) control group, (17b) PHM, (17c) PHHM, (17d) PSHM, (CV) central vein, x20 magnification; (A2) Adipocytes in intra-abdominal adipose tissue: (17e) control group, (17f) PHM, (17g) PHHM, (17h) PSHM, 20x magnification; (A3) Intestine tissue: (17i) control group, (17j) PHM, (17k) PHHM, (17l) PSHM, 10x magnification. (C) Crypts. **n = 8 animals/group**. Twenty images of each coloration per animal were captured directly from the light microscope (Zeiss®, Primo Star model, Oberkochen, Germany) through a photographic camera (Zeiss®, Aixo ERc5s model, Oberkochen, Germany).

Table 15: Statistical analysis of the histological assessments. Area of intra-abdominal adipose tissue and crypts number of intestine of animals fed with pasteurized human milk (PHMc), pasteurized-homogenized human milk (PHHMc), and pasteurized-skimmed human milk (PSHMc).

	Group			
	Control - water	PHMc	PHHMc	PSHMc
Adipocyte area (μm^2)	7581 \pm 1417a	7162 \pm 1765a	4010 \pm 1898b	5528 \pm 1853a
Crypt depth (μm)	150.75 \pm 28.6b	158.67 \pm 26.6b	189.75 \pm 20.6a	158.64 \pm 22.21b
Villus height (μm)	498.82 \pm 141.32a	513.24 \pm 182.41a	524.56 \pm 111.12a	494.21 \pm 131.12a
Villus width (μm)	79.58 \pm 45.25a	87.58 \pm 39.76a	77.66 \pm 41.60a	97.58 \pm 31.30a

Values expressed as **mean \pm SD**. Different letters on the same line: statistical difference by Tukey test ($p < 0.05$).

The liver histology can help identify diet changes and damage to health as the liver is an organ responsible for metabolizing and storing nutrients. The liver histology results (Figure 3) showed no degeneration, liver inflammation, and necrosis for any of the groups analyzed. The healthy appearance of the central vein was evident.

The ratio number of adipocytes/area of the adipose tissue showed a significant difference between the groups (Figure 3) by the Tukey test at the 5% level of significance. In the common area of the adipocytes, high averages were verified for the control group (7581 \pm 1417 μm^2), PHM group (7162 \pm 1765 μm^2), and PSHM (5528 \pm 1853 μm^2). The mean value of (4010 \pm 1898 μm^2) was determined for the PHHM group. (Orci et al., 2004) found approximately 5500 μm^2 as the average area of adipocytes, which corroborates our findings. Adipocytes are essential to be studied, as their metabolism affects body fat accumulation (Gao et al., 2015; Zhang et al., 2015). Besides, smaller adipocytes with a smaller area reduce the chances of rapid weight gain and obesity (Buccigrossi et al., 2007). The adipose tissue results indicate that rat gavage feeding using PHHM can reduce the area and the adipocyte's number.

The small intestine analysis reveals no difference in the intestinal villi's number, height, and width. Studies reported a direct correlation among the number, height, and width of the intestinal villi with the mother's diet during pregnancy and the first days of breastfeeding (Itzkovitz et al., 2012).

On the other hand, the crypts' depths showed a significant difference ($P < 0.05$) among groups. The PHHM group exhibited a higher average than the PHM group. The crypt

compartment has components that produce functional cells (O'Neill et al., 2012). Therefore, the ingested nutrients' profile is essential for the development and activity of the small intestine. Some milk constituents, such as lactoferrin, facilitates the baby's intestinal adaptation by developing absorption cells (Itzkovitz et al., 2012).

Microtomography analysis of the femur

The porosity of bone tissue is divided into cortical (compact, 10%) and trabecular (spongy, 90%). These proportions may vary because the trabecular part can be associated with the mineral deficiency; that is, the thicker the trabecular part, the smaller the mineral mass (Schober et al., 2019).

The result of the microtomography of the rat's femur is seen in Figure 18.

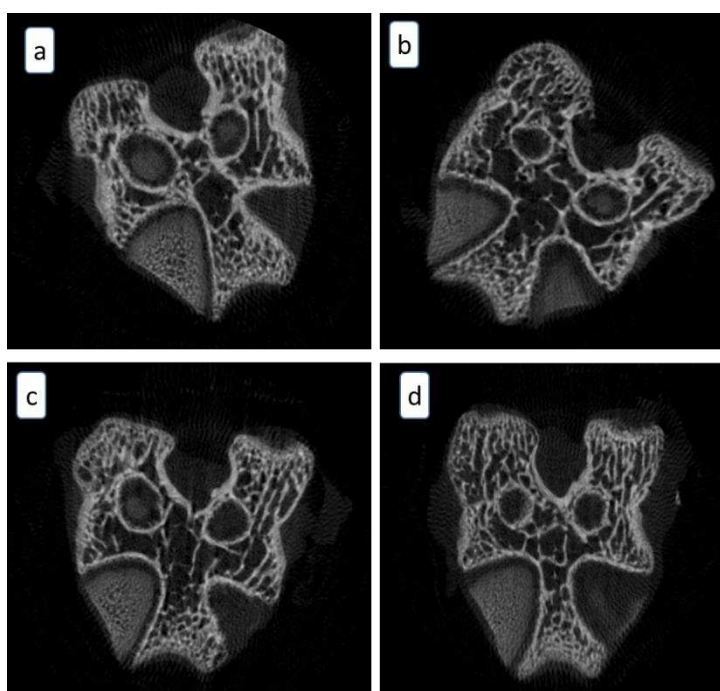


Figure 49: Effect of processed human milk intake on the trabecular bone cut: (4a) control group, (4b) PHM, (4c) PHHM, (4d) PSHM. $n = 8$ animals/group. A hundred images per animal were captured.

The variables tissue volume, trabecular thickness, trabecular number, and trabecular separation did not differ among groups ($p > 0.05$). Despite the lower feed intake by the animals of the homogenized human milk group, there was no bone tissue difference among the groups. Data of statistical equality shows the contribution of human milk intake to the ingestion of minerals and corroborates the feed efficiency ratio value determined in the present work.

7.4 Conclusions

Reducing fat content in non-homogenized human milk suggests that homogenization is crucial to minimize milk nutrients' retention in the enteral diet prototype's probes. The supplementation of Wistar rats' diet with human milk did not affect the blood biochemical parameters nor the feed efficiency ratio value. Such findings point out an adequate conversion of the food ingested into the mass gain. Histological analyzes of the intestine from the animals fed with homogenized-pasteurized human milk exhibited a healthy liver and an increment in the crypts' depth. The adipocyte count showed a difference between the rat groups treated with homogenized-pasteurized human milk and the other groups. The fatty acid profile of the animal brain tissue of the PHHM group changed after the gavage feeding, increasing the content of some essential fatty acids in brain tissue. The microtomography of the femur showed healthy bone tissues for all groups analyzed. The homogenization of human milk provided benefits to Wistar rats' diet and preserved the animals' health. Therefore, the homogenization stage in the process line of human milk can be considered a safe and promising approach to enhance the quality of milk in HMB.

Funding

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). The authors are grateful for the technical assistance of the Hospital São Sebastião, Viçosa, MG, Brazil during the accomplishment of this work.

7.5 References

- Aidoud, N., Delplanque, B., Baudry, C., Garcia, C., Moyon, A., Balasse, L., Guillet, B., Antona, C., Darmaun, D., Fraser, K., Ndiaye, S., Leruyet, P., & Martin, J.-C. (2018). A combination of lipidomics, MS imaging, and PET scan imaging reveals differences in cerebral activity in rat pups according to the lipid quality of infant formulas. *The FASEB Journal*, *32*(9), p. 4776–4790. <https://doi.org/10.1096/fj.201800034R>
- Ali, R. F. M. (2016). Hypocholesterolemic effects of diets containing different levels of kishk as a dried fermented milk–whole wheat mixture in experimental rats. *Journal of Ethnic Foods*, *3*(2), p. 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2016.01.009>
- Aljewicz, M., Tonska, E., Juskiwicz, J., & Cichosz, G. (2018). The influence of product acidity and beta-glucans isolated from various sources on the mineral composition and the mechanical and microstructural properties of the femur in growing Wistar rats. *Journal of Functional Foods*, *44*, p. 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.035>
- AOAC. (2019). *Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists* (21st ed.). <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/>
- Balakrishnan, J., Dhavamani, S., Sadasivam, S. G., Arumugam, M., Vellaikumar, S., Ramalingam, J., & Shanmugam, K. (2019). Omega-3-rich Isochrysis sp. biomass enhances brain docosahexaenoic acid levels and improves serum lipid profile and antioxidant status in Wistar rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(13), p. 6066–6075. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9884>
- Barreiro, R., Díaz-Bao, M., Cepeda, A., Regal, P., & Fente, C. A. (2018). Fatty acid composition of breast milk in Galicia (NW Spain): a cross-country comparison. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. *135*(13), p. 102–114. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2018.06.002>
- Blázquez-Medela, A. M., Jumabay, M., Rajbhandari, P., Sallam, T., Guo, Y., Yao, J., Vergnes, L., Reue, K., Zhang, L., Yao, Y., Fogelman, A. M., Tontonoz, P., Lusic, A. J., Wu, X., & Boström, K. I. (2019). Noggin depletion in adipocytes promotes obesity in mice. *Molecular Metabolism*, *25*, p. 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.04.004>
- BRASIL. Ministério da Saúde (2008). Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos. In D. R. de Mello (Ed. 1), *Organização do Banco de Leite e do Posto de Coleta*. Brasília, DF, 2008. <https://doi.org/Brasília>. <http://www.redeblh.fiocruz.br/media/blhanv2008.pdf>
- Brouwer-Brolsma, E. M., van de Rest, O., Godschalk, R., Zeegers, M. P. A., Gielen, M., & de Groot, R. H. M. (2017). Associations between maternal long-chain polyunsaturated fatty

- acid concentrations and child cognition at 7 years of age: The MEFAB birth cohort. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 126 (2), p. 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.09.012>
- Buccigrossi, V., De Marco, G., Bruzzese, E., Ombrato, L., Bracale, I., Polito, G., & Guarino, A. (2007). Lactoferrin induces concentration-dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation. *Pediatric Research*, 61(4), p. 410–414. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e3180332c8d>
- Cacho, N. T., & Lawrence, R. M. (2017). Innate immunity and Breast Milk. *Innate Immunity and Breast Milk. Front. Immunol*, 8(584), p. 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00584>
- Cavaliere, G., Trinchese, G., Musco, N., Infascelli, F., De Filippo, C., Mastellone, V., Morittu, V. M., Lombardi, P., Tudisco, R., Grossi, M., Monda, V., Cutrignelli, M. I., Messina, A., Calabrò, S., Moni, H. B., Stradella, L., Messina, G., Monda, M., Crispino, M., & Mollica, M. P. (2018). Milk from cows fed a diet with a high forage:concentrate ratio improves inflammatory state, oxidative stress, and mitochondrial function in rats. *Journal of Dairy Science*, 101(3), p.1843–1851. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13550>
- Claire, A., & Thomaz, P. (1999). *KEY WORDS: Human milk, homogenization, fat, fat absorption, newborn, low birth weight infants*. 19(4), p. 483–492.
- Correa, K. de P. (2017). Estudo de técnicas de homogeneização do leite humano para diminuição da retenção da gordura em sondas nasogástricas. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, p.76. 2017.
- Cunnane, S. C., Francescutti, V., Brenna, J. T., & Crawford, M. A. (2000). Breast-fed infants achieve a higher rate of brain and whole body docosahexaenoate accumulation than formula-fed infants not consuming dietary docosahexaenoate. In *Lipids*, 35 (1), p. 105–111. American Oil Chemists Society. <https://doi.org/10.1007/s11745-000-0501-6>
- Dias, M. M. e, Pais Siqueira, N., Lopes da Conceição, L., Aparecida dos Reis, S., Xavier Valente, F., Maciel dos Santos Dias, M., de Oliveira Barbosa Rosa, C., Oliveira de Paula, S., da Matta, S. L. P., Licursi de Oliveira, L., Bressan, J., & Gouveia Peluzio, M. do C. (2018). Consumption of virgin coconut oil in Wistar rats increases saturated fatty acids in the liver and adipose tissue, as well as adipose tissue inflammation. *Journal of Functional Foods*, 48 (1), p. 472–480. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.07.036>
- Floris, L. M., Stahl, B., Abrahamse-Berkeveld, M., & Teller, I. C. (2019). Human milk fatty acid profile across lactational stages after term and preterm delivery: a pooled data

- analysis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 156, p.102023. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.102023>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. . (1956). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 55(5), p. 999–1033. <http://www.jbc.org/content/226/1/497.long>
- Gao, Q., Jia, Y., Yang, G., Zhang, X., Boddu, P. C., Petersen, B., Narsingam, S., Zhu, Y. J., Thimmapaya, B., Kanwar, Y. S., & Reddy, J. K. (2015). PPAR α -deficient ob/ob obese mice become more obese and manifest severe hepatic steatosis due to decreased fatty acid oxidation. *American Journal of Pathology*, 185(5), p. 1396–1408. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.018>
- García-lara, N. R., Escuder-vieco, D., Díaz, C. A., Román, S. V., Cruz-bértolo, J. De, & Pallás-alonso, C. R. (2014). *Type of Homogenization and Fat Loss during Continuous Infusion of Human Milk*. 30 (4), p. 436–441. <https://doi.org/10.1177/0890334414546044>
- Gerster, H. (1998). Can adults adequately convert α -linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 68(3), p. 159–173.
- Gopaldas, M., Zanderigo, F., Zhan, S., Ogden, R. T., Miller, J. M., Rubin-Falcone, H., Cooper, T. B., Oquendo, M. A., Sullivan, G., Mann, J. J., & Sublette, M. E. (2019). Brain serotonin transporter binding, plasma arachidonic acid and depression severity: A positron emission tomography study of major depression. *Journal of Affective Disorders*, 257(10), p. 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.07.035>
- Hahn-Holbrook, J., Fish, A., & Glynn, L. M. (2019). Human milk omega-3 fatty acid composition is associated with infant temperament. *Nutrients*, 11(12). p. 2964 <https://doi.org/10.3390/nu11122964>
- Hartvigsen, M. S., Mu, H., & Høy, C. E. (2003). Influence of maternal dietary n-3 fatty acids on breast milk and liver lipids of rat dams and offspring - A preliminary study. *Nutrition Research*, 23(6), p. 747–760. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(03\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(03)00030-7)
- Havlicekova, Z., Jesenak, M., Banovcin, P., & Kuchta, M. (2016). Beta-palmitate - A natural component of human milk in supplemental milk formulas. *Nutrition Journal*, 15(1). p.1-28. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0145-1>
- Innis, S. M., Dyer, R., & Nelson, C. M. (1994). Evidence That Palmitic Acid Is Absorbed as sn-2 Monoacylglycerol from Human Milk by Breast-Fed Infants. In *Lipids*, 29(8). p.541-545. <https://doi.org/10.1007/BF02536625>
- Isaacs, E. B., Fischl, B. R., Quinn, B. T., Chong, W. K., Gadian, D. G., & Lucas, A. (2010).

- Impact of breast milk on intelligence quotient, brain size, and white matter development. *Pediatric Research*, 67(4), p. 357–362. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181d026da>
- Itzkovitz, S., Blat, I. C., Jacks, T., Clevers, H., & Van Oudenaarden, A. (2012). Optimality in the development of intestinal crypts. *Cell*, 148(3), p. 608–619. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.025>
- Kang, S. M., Jhoo, J. W., Pak, J. I., Kwon, I. K., Lee, S. K., & Kim, G. Y. (2015). Effect of yogurt containing deep sea water on health-related serum parameters and intestinal microbiota in mice. *Journal of Dairy Science*, 98(9), p. 5967–5973. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9492>
- Kelleher, S. L., Chatterton, D., Nielsen, K., & Lönnerdal, B. (2003). Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), p.1261–1268. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1261>
- Lemieux, I., Lamarche, B., Couillard, C., Pascot, A., Cantin, B., Bergeron, J., Dagenais, G. R., & Després, J. P. (2001). Total cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/HDL cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men. *Archives of Internal Medicine*, 161(22), p. 2685–2692. <https://doi.org/10.1001/archinte.161.22.2685>
- Martinez, F. E., Desai, I. D., Davidson, A. G. F., Nakai, S., & Radcliffe, A. (1987). Ultrasonic Homogenization of expressed human milk to prevent fat loss during tube feeding. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 6(4), p. 593–597.
- McClements, D. J. (2005). *Food Emulsion: Principles, Practices, and Techniques* (C. PRESS (ed.); 2nd ed.).
- Medeiros da Silva, R., Restle, J., Luis Missio, R., Evandro Lage, M., Santana Pacheco, P., Oliveira Bilego, U., Teodoro Pádua, J., & Aparecida Fausto, D. (2014). Perfil de ácidos graxos da carne de novilhos europeus e zebuínos alimentados com milho Fatty acid profile of meat from European and Zebu bulls fed with pearl millet. *Pesq. Agropec. Bras*, 49(1), p. 63–70. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000100009>
- Mehrotra, V., Sehgal, S. K., & Bangale, N. R. (2019). Fat structure and composition in human milk and infant formulas: Implications in infant health. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 7(2), p. 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2018.03.005>
- Meier, P. P., Engstrom, J. L., Patel, A. L., Jegier, B. J., & Bruns, N. E. (2010). Improving the use of human milk during and after the NICU stay. In *Clinics in Perinatology*, 37 (1), p. 217–245. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2010.01.013>
- Milner, J. A., & Allison, R. G. (1999). The Role of Dietary Fat in Child Nutrition and

- Development: Summary of an ASNS Workshop. *The Journal of Nutrition*, 129(11), p. 2094–2105. <https://doi.org/10.1093/jn/129.11.2094>
- Nishimura RY, de Castro GSF, Jordão Junior AA, Sartorelli DS (2013) Breast milk fatty acid composition of women living far from the coastal area in Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 89, p. 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2012.11.007>
- O'Neill, K. R., Stutz, C. M., Mignemi, N. A., Burns, M. C., Murry, M. R., Nyman, J. S., & Schoenecker, J. G. (2012). Micro-computed tomography assessment of the progression of fracture healing in mice. *Bone*, 50(6), p.1357–1367. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.03.008>
- Orci, L., Cook, W. S., Ravazzola, M., Wang, M. Y., Park, B. H., Montesano, R., & Ungert, R. H. (2004). Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), p. 2058–2063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308258100>
- Rayol, M. R. S., Martinez, F. E., Jorge, S. M., Goncalves, A. L., & Desai, I. D. (1993). Feeding premature infants banked human milk homogenized by ultrasonic treatment. *The Journal of Pediatrics*, 123(6), p. 985–988. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)80399-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)80399-3)
- Rayyan, M., Rommel, N., & Allegaert, K. (2015). The fate of fat: Pre-exposure fat losses during nasogastric tube feeding in preterm newborns. *Nutrients*, 7(8), p. 6213–6223. <https://doi.org/10.3390/nu7085279>
- Rosa, D. D., Grześkowiak, L. M., Ferreira, C. L. L. F., Fonseca, A. C. M., Reis, S. A., Dias, M. M., Siqueira, N. P., Silva, L. L., Neves, C. A., Oliveira, L. L., MacHado, A. B. F., & Peluzio, M. D. C. G. (2016). Kefir reduces insulin resistance and inflammatory cytokine expression in an animal model of metabolic syndrome. *Food and Function*, 7(8), p. 3390–3401. <https://doi.org/10.1039/c6fo00339g>
- Schober, M. E., Requena, D. F., Maschek, J. A., Cox, J., Parra, L., & Lolofie, A. (2019). Effects of controlled cortical impact and docosahexaenoic acid on rat pup fatty acid profiles. *Behavioural Brain Research*, 378 (1), p.112295. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112295>
- Silva, M. E. T. da, Correa, K. de P., Martins, M. A., da Matta, S. L. P., Martino, H. S. D., & Coimbra, J. S. dos R. (2020). Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. *Journal of Functional Foods*, 65, p. 103711. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103711>
- Stocks, R. J., Davies, D. P., Allen, F., & Seweel, D. (1985). Loss of breast milk nutrients during tube feeding. *Archives of Disease in Childhood*, 7, p.164–167. <https://doi.org/10.1136/>

adc.60.2.164

- Su, M., Subbaraj, A. K., Fraser, K., Qi, X., Jia, H., Chen, W., Gomes Reis, M., Agnew, M., Day, L., Roy, N. C., & Young, W. (2019). Lipidomics of Brain Tissues in Rats Fed Human Milk from Chinese Mothers or Commercial Infant Formula. *Metabolites*, 9(11), p. 253. <https://doi.org/10.3390/metabo9110253>
- Taylor, S. N. (2019). Solely human milk diets for preterm infants. *Seminars in Perinatology*, 43(7), p.151158. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2019.06.006>
- Trinchese, G., Cavaliere, G., Canani, R. B., Matamoros, S., Bergamo, P., De Filippo, C., Aceto, S., Gaita, M., Cerino, P., Negri, R., Greco, L., Cani, P. D., & Mollica, M. P. (2015). Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by modulating mitochondrial function and gut microbiota. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(11), p.1136–1146. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.05.003>
- Victora, C. G., Adair, L., Fall, C., Hallal, P. C., Martorell, R., Richter, L., & Sachdev, H. S. (2008). Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *The Lancet*, 371(9609), p. 340–357. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61692-4)
- Walsh, C., Lane, J. A., van Sinderen, D., & Hickey, R. M. (2020). Human milk oligosaccharides: Shaping the infant gut microbiota and supporting health. *Journal of Functional Foods*, 72(2), p.104074. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104074>
- Wang L, Li X, Hussain M, et al (2019) Effect of lactation stages and dietary intake on the fatty acid composition of human milk (A study in Northeast China). *Int Dairy J*, 100 (2), p.104580. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104580>
- Wu, K., Zhu, J., Zhou, L., Shen, L., Mao, Y., Zhao, Y., Gao, R., Lou, Z., Cai, M., & Wang, B. (2020). Lactational changes of fatty acids and fat-soluble antioxidants in human milk from healthy Chinese mothers. *British Journal of Nutrition*, 123(8), p. 841–848. <https://doi.org/10.1017/S0007114520000239>
- Wu, R. Y., Johnson-Henry, K. C., & Sherman, P. M. (2020). Prebiotics and Human Milk Oligosaccharides. *Encyclopedia of Gastroenterology*, 67(2), p.278–286. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.66049-x>
- Yuan, T., Zhang, H., Wang, X., Yu, R., Zhou, Q., Wei, W., Wang, X., & Jin, Q. (2019). Triacylglycerol containing medium-chain fatty acids (MCFA-TAG): The gap between human milk and infant formulas. *International Dairy Journal*, 99, p. 104545. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104545>
- Zhang, H., Guan, M., Townsend, K. L., Huang, T. L., An, D., Yan, X., Xue, R., Schulz, T. J.,

- Winnay, J., Mori, M., Hirshman, M. F., Kristiansen, K., Tsang, J. S., White, A. P., Cypess, A. M., Goodyear, L. J., & Tseng, Y. (2015). Micro RNA -455 regulates brown adipogenesis via a novel HIF 1 α - AMPK - PGC 1 α signaling network . *EMBO Reports*, *16*(10), p.1378–1393. <https://doi.org/10.15252/embr.201540837>
- Zhao, L., Du, M., & Mao, X. (2019). Change in interfacial properties of milk fat globules by homogenization and thermal processing plays a key role in their in vitro gastrointestinal digestion. *Food Hydrocolloids*, *96*, p.331–342. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2019.05.034>

8 CONCLUSÕES

Em termos tecnológicos e científicos a operação unitária de homogeneização foi muito importante, uma vez que buscou evitar a coalescência da fração lipídica do leite humano durante seu processamento e armazenamento. De acordo com os dados encontrados, a homogeneização permitiu obter uma qualidade (perfil lipídico) do leite humano ordenhado homogeneizado pasteurizado armazenado que foi escoado pelas sondas de alimentação superior ao leite humano ordenhado pasteurizado. Dentre as técnicas de homogeneização testadas, foi possível concluir que a técnica realizada com o processador *mixer* foi a mais adequada para ser adicionada a uma linha de processamento de leite humano devido a sua alta eficiência, simplicidade de operação e baixo custo de aquisição e processamento. O LHOHP manteve sua eficácia na redução de retenção de gordura nas sondas durante os 6 meses de armazenamento. A homogeneização não alterou o perfil de proteínas e nem o perfil de ácidos graxos do leite humano. Além disso, foi possível observar que ao utilizar o leite humano na suplementação da dieta dos ratos *Wistar*, os animais alimentados com LHOHP apresentaram uma maior concentração de ácidos graxos essenciais com o DHA no cérebro e um menor diâmetro médio dos adipócitos. Assim, em termos tecnológicos e científicos espera-se que a inserção da técnica de homogeneização na linha de processamento do leite humano ordenhado contribua para diminuir a retenção de gordura do mesmo em sondas nasogástricas levando a um melhor aproveitamento da carga calórica do leite, além de manter o perfil lipídico e proteico do leite humano.

APÊNDICE A - Notas

Tabela 16: Relação dos resultados de concentração de gordura (%) obtidos pela análise de Gerber e Crematório.

Técnica	T0			T1			T2			T3			T4			T5			T6		
	C	M	U	C	M	U	C	M	U	C	M	U	C	M	U	C	M	U	C	M	U
Gerber	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,0	3,2 ± 0,2	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,2 ± 0,1	3,0 ± 0,2	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,2	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,2	2,8 ± 0,2	3,0 ± 0,2	3,2 ± 0,1	2,6 ± 0,2	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,2
Crematócrito	3,4 ± 0,3	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,0 ± 0,3	3,3 ± 0,2	3,4 ± 0,1	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,1	3,2 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,3 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,8 ± 0,3	3,2 ± 0,1	3,3 ± 0,2	2,7 ± 0,2	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,2	2,6 ± 0,3	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,2

Valores ± Desvio padrão da média

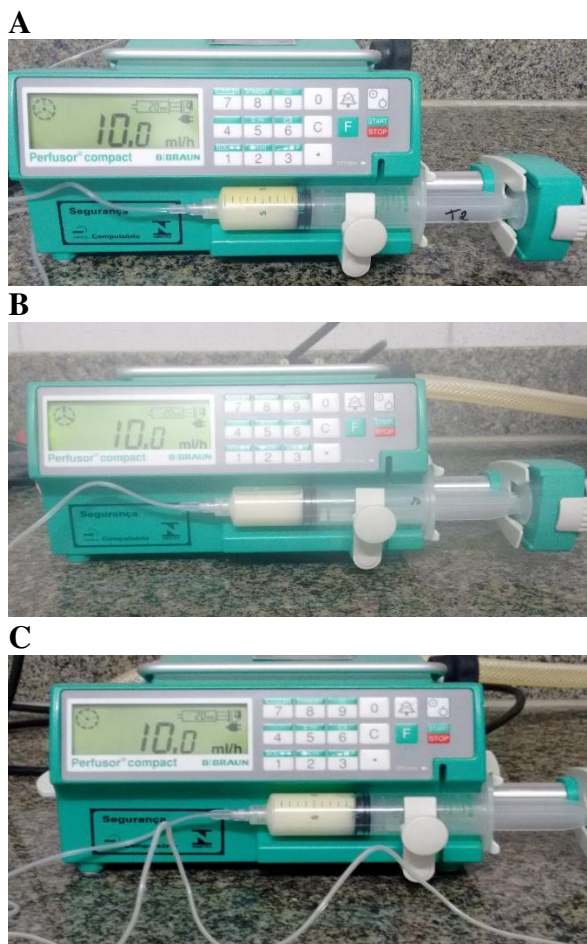


Figura 50: Simulação de alimentação por sondas com leite humano. (A) Leite humano ordenhado pasteurizado. (B) Leite humano homogeneizado (processador *mixer*) e pasteurizado. (C) Leite humano homogeneizado (ultrassom de sondas) e pasteurizado. Observação: Na figura A é possível observar a separação de gordura (coalescência) no leite humano.