



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE NUTRIÇÃO**



Adriana Caroline Resende Santos

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTABILIDADE LIPÍDICA DO LEITE HUMANO  
TERMOSSONICADO APÓS ARMAZENAMENTO CONGELADO POR 120 DIAS**

**OURO PRETO  
2020**

Adriana Caroline Resende Santos

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTABILIDADE LIPÍDICA DO LEITE HUMANO  
TERMOSSONICADO APÓS ARMAZENAMENTO CONGELADO POR 120 DIAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Nutrição, da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Nutrição.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Camila Carvalho Menezes

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Cristina Passos

**OURO PRETO**

**2020**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S237a Santos, Adriana Caroline Resende .  
Atividade antioxidante e estabilidade lipídica do leite humano  
termossonicado após armazenamento congelado por 120 dias.  
[manuscrito] / Adriana Caroline Resende Santos. - 2020.  
52 f.: il.: color., gráf..

Orientadora: Profa. Dra. Camila Carvalho Menezes.  
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Passos.  
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.  
Escola de Nutrição. Graduação em Nutrição .

1. Banco de Leite Humano. 2. Ultrassom. 3. Leite congelado. I.  
Menezes, Camila Carvalho. II. Passos, Maria Cristina . III. Universidade  
Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 612.664

Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB6/2247



**Ministério da Educação  
Universidade Federal de Ouro Preto  
Escola de Nutrição**



**Ata da Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado:**

**"ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTABILIDADE LIPÍDICA DO LEITE HUMANO  
TERMOSSONICADO APÓS ARMAZENAMENTO CONGELADO POR 120 DIAS".**

Aos trinta dias do mês de novembro de 2020, às 14 horas, via Google Meet no link: <https://meet.google.com/xnn-khqr-cnp> (apresentação remota/online), reuniu-se a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso da estudante ADRIANA CAROLINE RESENDE SANTOS, orientada pela Professora Camila Carvalho Menezes Salierno e co-orientada pela professora Maria Cristina Passos. A defesa iniciou-se pela apresentação oral feita pela(o) estudante, seguida da arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a estudante.

**Membros da Banca Examinadora:**

**Camila Carvalho Menezes Salierno**  
Presidente (DEALI/ENUT/UFOP)

**Prof.ª Melina Oliveira de Souza**  
Examinadora (DEALI/ENUT/UFOP)

**Doutoranda Jaísa Oliveira Chaves**  
Examinadora (UNICAMP)

## AGRADECIMENTOS

Concluir esse trabalho em meio a todos os obstáculos e mudanças de planos é um carinho de Deus. Por isso, agradeço e dedico esse trabalho a Ele que é o meu refúgio, meu amparo e minha força. Como é bom poder contar com o auxílio do Amor. Não poderia deixar de mencionar o cuidado maternal da Virgem Maria durante todo esse tempo. Eu sou toda tua, Maria, e tudo o que é meu te pertence!

Aos meus pais, Andreia e Adriano, o meu muito obrigada por todo o apoio e amor incondicionais durante esse caminho. Obrigada principalmente pela compreensão e paciência comigo, é um privilégio ter vocês ao meu lado. Ao meu irmão, Augusto, agradeço pelos abraços apertados sempre que retornava para casa, eles me incentivaram a continuar. Ao Caio, meu amigo e amor, obrigada por todo o incentivo e apoio nesses anos, eu não chegaria até aqui sem você. Agradeço também a todos os meus familiares e amigos sempre presentes, pois o amor e apoio de cada um de vocês foi essencial. Em especial, agradeço ao meu querido avô, Antônio, pelas lágrimas de despedida quando eu precisava voltar aos estudos. Recordo-me sempre delas e isso é um dos meus maiores incentivos e, portanto, deixo aqui este trabalho em sua memória. Às minhas queridas amigas Esthér, Ivana, Letícia e Tamara, meu quinteto fantástico, agradeço pelo ombro amigo e por serem meu suporte em vários momentos, ter vocês comigo torna essa fase da minha vida muito mais leve. O meu amor e gratidão a cada um de vocês é inefável.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Camila, minha orientadora e por quem tenho uma admiração imensa, por todo o conhecimento compartilhado e pela paciência comigo durante a realização desse trabalho. Você é uma das minhas referências de dedicação e não sei como seria sem a sua ajuda! À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina, o meu muito obrigada pelas contribuições e pela oportunidade de adentrar esse mundo da nutrição materno-infantil. O seu amor a esta área me inspira e encanta!

À Janaína, Joseane, Letícia e Thaís, companheiras que o laboratório me proporcionou, agradeço de coração pela parceria e conhecimento compartilhado. Agradeço em especial à Janaína, pela oportunidade de colaborar com o seu trabalho. Formamos uma bela equipe!

Não poderia deixar de agradecer aos técnicos de laboratório da Escola de Nutrição: Gustavo, Miliane, Rafael, Bruno, Beringher e Lourival. Obrigada pela disponibilidade e ajuda. À técnica Ananda, do laboratório de Espectrometria de Massa

do Instituto de Ciências Biológicas da UFOP, agradeço pela paciência e por todo o conhecimento que pude adquirir.

Um agradecimento mais que especial às doadoras de leite humano, cadastradas no Projeto de Extensão Mãe de Leite, que se dispuseram a doar e contribuir com a realização deste trabalho.

Agradeço também à Universidade Federal de Ouro Preto, à Escola de Nutrição e à Pró-Reitoria de Pós Graduação e Inovação (PROPPI-UFOP).

Obrigada a cada um de vocês! Deus os abençoe imensamente!

“Fazei tudo por Amor. Assim não há coisas pequenas: tudo é grande.  
A perseverança nas pequenas coisas, por Amor, é heroísmo.”

São Josemaria Escrivá

## RESUMO

O leite humano é considerado o alimento ideal para criança nos seus primeiros anos de vida. Nos casos em que a mãe de um recém-nascido prematuro e/ou com baixo peso ao nascer, que se encontra na UTI neonatal, não consegue suprir a demanda do bebê, o recomendado é que este receba o LH doado dos Bancos de Leite Humano. Nesses locais, o leite é submetido a um tratamento térmico denominado pasteurização lenta (62,5 °C por 30 minutos), a fim de garantir a sua qualidade microbiológica. No entanto, esse processamento pode impactar na sua qualidade nutricional, ocasionando perdas importantes de nutrientes e compostos bioativos, tais como os lipídios e os antioxidantes. O leite humano pasteurizado também pode ser armazenado a uma temperatura máxima de -3 °C até ser oferecido aos bebês, o que também pode interferir na sua composição. Logo, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do armazenamento congelado a -18 °C ( $\pm 2$ ) por 120 dias na estabilidade lipídica e na atividade antioxidante do LH após a termossonicação. Para isso, utilizamos amostras de leite humano pasteurizadas como controle. As concentrações de  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\beta$  tocoferóis foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* - HPLC). Avaliou-se a atividade antioxidante total do leite humano por meio dos métodos de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e redução do íon ferro (FRAP). As concentrações de hexanal, um composto secundário da degradação lipídica, foram determinadas por cromatografia gasosa. O uso da termossonicação no presente estudo, decorridos os 120 dias de armazenamento congelado, demonstrou ser uma possível alternativa à pasteurização. As reduções de  $\gamma$ ,  $\beta$  e  $\alpha$  tocoferóis foram semelhantes às do leite pasteurizado e as perdas na atividade antioxidante total, avaliadas pelos métodos FRAP e DPPH, foram significativamente menores no leite termossonicado. Por outro lado, foram observadas maiores concentrações de hexanal no leite termossonicado. Portanto, a realização de novos estudos que avaliem os efeitos da termossonicação na composição do leite humano após o armazenamento congelado será importante para definir realmente os benefícios desse método não convencional de processar o leite humano.

**Palavras-chave:** banco de leite humano, ultrassom, congelamento, tocoferóis e hexanal.



## ABSTRACT

Human Milk's considered ideal for feeding babies in the first years of life. When mothers of preterm infants or low in weight can't supply the demand of your newborns, the donor human milk from Human Milk Banks is the best recommendation. In the Human Milk Banks, the donor human milk undergoes heat treatment process, such as pasteurization. This treatment has the purpose of the inactivation of pathogenic microorganisms. However, the slow pasteurization affects some of nutrients and bioactives compounds present in human milk, such as lipids and antioxidant components. The pasteurized donor human milk can be storage at maximum temperature of -3 °C for six months or until offered to babies, this practice can also affect the composition of donor human milk. This study evaluated the effects of frozen storage at  $\pm 18$  °C for 120 days in the lipids stability and in antioxidant capacity after the termossonication. For this, we used human milk pasteurized samples for the control. Were analyzed the levels of tocopherol isoforms ( $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\beta$ ) by high performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant capacity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging, and the Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP). The levels of hexanal, a secondary compound of lipid oxidation, was analyzed by gas chromatography. The use of termossonication in this study, after 120 days of frozen storage, demonstrated to be a possible alternative to slow pasteurization. The reductions in the levels of  $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\beta$  tocopherols was similar to the human milk pasteurized and losses in total antioxidant capacity, evaluated by DPPH and FRAP methods, were significantly lower in human milk after the termossonication. On the other hand, higher concentrations of hexanal was observed in the human milk termossonication. Therefore, further studies need to be conducted to assess the effect of termossonication in the nutritional composition and bioactives compounds of human milk after frozen storage.

**Keywords:** human milk bank, ultrasound, freezing, tocopherols, hexanal.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Fluxo de trabalho preconizado nos Bancos de Leite Humano do Brasil. .22	22
<b>Figura 2</b> - Desenho experimental do estudo.....31	31
<b>Figura 3</b> – Cromatograma evidenciando os picos das isoformas $\alpha$ , $\gamma$ e $\beta$ tocoferol em uma amostra de leite humano. ....34	34
<b>Figura 4</b> – Presença de $\gamma$ e $\beta$ tocoferóis nas amostras de leite humano após os processamentos (pasteurização e termossonicação) e armazenamento congelado (-18 °C) por 120 dias.....37	37
<b>Figura 5</b> – Presença de $\alpha$ -tocoferol nas amostras de leite humano após os processamentos (pasteurização e termossonicação) e armazenamento congelado (-18°C) por 120 dias.....38	38
<b>Figura 6</b> – Atividade antioxidante nas amostras de leite humano após os processamentos (pasteurização e termossonicação) e armazenamento congelado (-18°C) por 120 dias pelo método FRAP. ....40	40
<b>Figura 7</b> – Atividade antioxidante nas amostras de leite humano após os processamentos (pasteurização e termossonicação) e armazenamento congelado (-18°C) por 120 dias pelo método DPPH.....40	40
<b>Figura 8</b> – Presença de hexanal nas amostras de leite humano após os processamentos (pasteurização e termossonicação) e armazenamento congelado (-18°C) por 120 dias.....42	42

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AG – Ácidos Graxos

AGI – Ácidos Graxos Insaturados

AGL – Ácidos Graxos Livres

AGPI – Ácidos Graxos Poliinsaturados

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARA – Ácido Araquidônico

BHT – Butil-hidroxitolueno

BLH – Banco de Leite Humano

DHA – Ácido decosahexanóico

DPPH – 2,2-difenil-1- picrilhidrazila

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

FRAP – Redução do Íon Ferro

HCL – Ácido Clorídrico

KOH – Hidróxido de Potássio

LH – Leite Humano

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCLHs – Postos de Coleta de Leite Humano

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TPTZ – 2,4,6-tri(2- piridil)-s-triazina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1 Leite Humano .....	15
2.1.1 Antioxidantes no leite humano .....	16
2.1.2 Composição Lipídica do leite humano .....	18
2.2 Banco de Leite Humano .....	20
2.3 Pasteurização e efeitos nas propriedades nutricionais do leite humano .....	22
2.4 Efeitos do armazenamento na qualidade nutricional do leite humano .....	25
2.5 Ultrassom no leite humano .....	25
3. OBJETIVOS .....	29
3.1 Objetivo Geral .....	29
3.2. Objetivo Específico.....	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1 Obtenção do leite humano .....	30
4.2 Delineamento Experimental .....	31
4.3 Processamento do leite humano .....	32
4.3.1 Pasteurização Lenta.....	32
4.3.2 Termossonicação .....	32
4.4 Análises Químicas.....	33
4.4.1 Tocoferóis.....	33
4.4.2 Análises da atividade antioxidante .....	34
4.4.2.1 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	34
4.4.2.2 FRAP (Redução do Íon Ferro).....	35
4.4.3 Hexanal .....	35
4.5 Análises estatísticas .....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37

6. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO 1 - Carta de Anuência .....	50
APÊNDICE 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

A diminuição do impacto dos processamentos nas características nutricionais dos alimentos vem sendo alvo de diversos estudos e, nesse contexto, o ultrassom tem se mostrado uma tecnologia alternativa segura e eficiente. Esse processamento consiste em ondas sonoras com frequências que superam a audição humana, e tem por objetivo reduzir o tratamento e manter a qualidade nutricional dos alimentos (AWAD *et al.*, 2012; SORIA; VILLAMIEL, 2010). Segundo Piyasena, Mohareb e McKellar (2003), o ultrassom, quando combinado a pressão e/ou calor, tem demonstrado melhores resultados na conservação das características sensoriais e nutricionais dos alimentos que são normalmente submetidos aos tratamentos térmicos mais comuns, como a pasteurização e a esterilização. Nesse contexto, alguns estudos vêm sendo realizados a fim de verificar os efeitos da termossonicação, que é o ultrassom aliado ao calor, no leite humano (LH) (PARREIRAS *et al.*, 2020; CZANK; SIMMER; HARTMANN, 2010).

Sabe-se que o LH é considerado o alimento ideal para o recém-nascido nos seus primeiros anos de vida, pois possui uma composição nutricional variada e fornece todos os nutrientes e compostos bioativos necessários para o desenvolvimento e crescimento saudável (BRASIL, 2019). Bebês prematuros e/ou doentes, internados em UTIs neonatais, dos quais as mães não conseguem suprir sua necessidade de LH, podem se beneficiar do recebimento do leite das doadoras dos Bancos de Leite Humano (BLHs). Para que possa ser ofertado de forma segura a esses recém-nascidos, o LH doado é submetido a um processamento chamado pasteurização lenta (62,5 °C por 30 minutos, após o pré-aquecimento) depois de ser aprovado pelos testes de controle de qualidade. Esse tratamento visa a eliminação do microrganismo mais termorresistente não esporulado que, no LH, é a *Coxiella burnet*. Dessa forma, assegura-se a eliminação dos demais microrganismos não esporulados e a qualidade sanitária do leite (BRASIL, 2008; BRASIL, 2006). Após esse tratamento térmico, o LH doado pode ser armazenado congelado a uma temperatura máxima de -3 °C por até seis meses (BRASIL, 2006).

Apesar de serem eficientes na inativação de microrganismos, alguns nutrientes e substâncias bioativas são perdidos com a pasteurização e posterior armazenamento do LH (GAO *et al.*, 2019; GILA-DIAZ *et al.*, 2019). Estudos tem demonstrado os efeitos significativos da pasteurização na redução de compostos antioxidantes como a

vitamina E, cuja ação é, principalmente, direcionada a proteção dos lipídios das membranas celulares (GILA-DIAZ *et al.*, 2019). Também foram observadas perdas nas concentrações de lipídios e formação de aldeídos, como o hexanal, que, entre outros compostos, é um indicador de perda da estabilidade lipídica (GARCÍA-LARA *et al.*, 2013; ELISIA; KITTIS, 2011; VIEIRA *et al.*, 2011). Quanto ao armazenamento congelado após o tratamento térmico, também foram observadas reduções nas concentrações de lipídios e compostos antioxidantes (GILA-DIAZ *et al.*, 2019; NESSEL; KHASHU; DYALL, 2019; GARCÍA-LARA *et al.*, 2013).

Em relação aos efeitos da termossonicação nas características nutricionais e microbiológicas do LH, Czank, Simmer e Hartmann (2010) destacam a sua maior eficiência quando comparada ao ultrassom isoladamente, pois requer um menor tempo de exposição do leite ao tratamento para a inativação dos microorganismos analisados (*Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*). Parreiras *et al.* (2020), além de observarem efeitos positivos do uso da termossonicação na inativação dos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Salmonella*, verificaram que as concentrações de retinol no LH não sofreram alterações e a atividade antioxidante apresentou um aumento significativo. Não há na literatura estudos que avaliaram os efeitos do armazenamento congelado no LH termossonicado, porém, diante do exposto, percebe-se a importância de buscar processamentos alternativos que conservem a composição nutricional do LH doado e que garantam a sua qualidade microbiológica. E no caso deste estudo, especialmente a composição em lipídios, pois contribuem com cerca de 50 a 60% do valor energético total do leite, fornecem ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e vitaminas lipossolúveis, além de compostos antioxidantes como a vitamina E, que exerce o papel de proteger esses AGPI da oxidação lipídica (GILA-DIAZ *et al.*, 2019; EUCLYDES, 2014). Estudar essas alterações após o armazenamento congelado também é de extrema relevância, uma vez que esta é uma prática comum nos BLHs e que também podem afetar a qualidade nutricional do LH doado.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Leite Humano

O LH é de suma importância para a saúde da criança e se adapta às suas necessidades nos primeiros anos de vida (BRASIL, 2019; MIMOUNI *et al.*, 2017; BALLARD; MORROW, 2013). Com uma composição nutricional balanceada, oferece todos os nutrientes essenciais, suprimindo assim as necessidades nutricionais da criança até os seis meses, além de ofertar componentes bioativos não nutritivos. A presença dessas substâncias bioativas confere ao LH a característica de ser um alimento funcional, isto é, ele não é apenas uma fonte de nutrientes e sim um alimento que gera efeitos fisiológicos benéficos, exercendo outras funções além de nutrir (EUCLYDES, 2014). Dentre esses compostos, destacam-se os agentes anti-infecciosos e anti-inflamatórios que contribuem para a proteção imunológica, os fatores de crescimento, os diferentes tipos de hormônios e as enzimas digestivas (KOLETZKO, 2016; BALLARD; MORROW, 2013; CALIL; FALCÃO, 2003). Uma vez que os hábitos alimentares desenvolvidos nos primeiros dois anos da criança influenciam em toda sua vida, recomenda-se a amamentação exclusiva desde a primeira hora de vida até os seis meses e, após esse período, até os dois anos ou mais, aliada a uma alimentação complementar saudável (BRASIL, 2019).

Muitos são os benefícios provenientes da amamentação, tanto para o bebê, como para a mulher. Para o bebê, o aleitamento o protege de infecções como otite, diarreia e pneumonia, e promove um menor risco de obesidade, asma e diabetes. Para a mulher, os benefícios incluem a redução da incidência de câncer de mama, de ovário e de útero, e também diminui o risco de diabetes tipo 2. Esses benefícios são maiores conforme o tempo de amamentação se estende, ou seja, quanto maior for o tempo de aleitamento, maiores serão os benefícios para a saúde da criança e da mulher (BRASIL, 2019; GEORGE *et al.*, 2018).

Algumas modificações ocorrem na composição do LH durante os estágios de lactação. Cerca de 3 a 5 dias após o parto é produzido o colostro, o qual contém maiores quantidades de proteína, vitaminas A e E, e minerais como sódio, cloreto e magnésio. A maior parte da fração proteica do colostro é composta por imunoglobulinas, especialmente a IgA, o que indica que sua principal função é fornecer proteção imunológica. O colostro também possui uma menor quantidade de



lactose em relação aos demais estágios. Após o quinto dia, o LH sofre uma modificação gradual em sua composição, caracterizada pelo aumento da produção e da concentração de lipídios. Nesse período, o LH é denominado leite de transição e ainda contém características semelhantes ao colostro. Essas modificações ocorrem para possibilitar a produção do leite maduro, o último estágio de lactação (BZIKOWSKA *et al.*, 2018; EUCLYDES, 2014; BALLARD; MORROW, 2013).

O leite maduro é produzido cerca de quinze dias após o parto e é caracterizado por uma menor concentração de proteínas quando comparado ao colostro. Em contrapartida, a lactose tem sua concentração aumentada, estima-se que seja em 70-74g/L de LH. Os lipídios também estão presentes em maiores concentrações e são responsáveis por cerca de 50 a 60% do valor calórico (EUCLYDES, 2014).

Em relação à duração da mamada e as variações na composição do LH, sabe-se que, no início, o leite contém maior quantidade de água e eletrólitos, a fim de possibilitar a hidratação do lactente, e contém também alguns anticorpos importantes para a proteção imune. Ao final da mamada, o leite contém uma maior concentração de gorduras, o que confere uma coloração mais amarelada (BRASIL, 2019).

### **2.1.1 Antioxidantes no leite humano**

Atualmente, o LH é reconhecido por oferecer ao bebê, além dos macros e micronutrientes necessários, compostos bioativos que contribuem para o seu crescimento e desenvolvimento. Os agentes anti-inflamatórios são um desses compostos e nestes estão incluídos os antioxidantes (EUCLYDES, 2014). Pode-se atribuir aos antioxidantes a atividade de inibir experimentalmente a oxidação ou, a depender de sua estrutura química, eliminar radicais livres. Os radicais livres são moléculas que contém um ou mais elétrons livres, o que as torna altamente reativas. Um exemplo de radicais livres são as espécies reativas de oxigênio (ERO) e seus efeitos são neutralizados pelos antioxidantes (MATOS; RIBEIRO; GUERRA, 2015), os quais podem ser classificados como primários ou sinérgicos. Os primários, como os tocoferóis, são aqueles que exercem a função de doar hidrogênio aos radicais livres, inativando-os nas fases de iniciação e propagação da autooxidação, um dos mecanismos de oxidação lipídica, impedindo a reação em cadeia. Os sinérgicos são os que atuam removendo o oxigênio do meio, estabilizando-os e inibindo a

autoxidação, ou atuam se complexando a substâncias como o ferro e o cobre, que catalisam a reação de oxidação. Estes podem atuar também na regeneração de antioxidantes primários, podendo inclusive aumentar a atividade antioxidante destes e, como exemplo, tem-se a vitamina C (RAMALHO; JORGE, 2006).

Em recém-nascidos a mudança do ambiente intrauterino para o extrauterino resulta em um aumento das ERO e, conseqüentemente, há um aumento da demanda de substâncias antioxidantes. O estresse oxidativo nessa fase dos bebês aumenta o risco de infecções e pode resultar em dificuldade respiratória, displasia broncopulmonar, enterocolite necrosante, entre outros. Devido a composição do LH, principalmente em relação a sua atividade antioxidante, nota-se a importância do aleitamento nos primeiros dias de vida do bebê (GILA-DIAZ *et al.*, 2019; HANSON *et al.*, 2016; MATOS; RIBEIRO; GUERRA, 2015).

A função antioxidante do LH se dá devido à combinação de moléculas endógenas (catalase, glutathione, glutathione peroxidase, melatonina, superóxido desmutase) e exógenas (licopeno, retinol,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -tocoferol e  $\gamma$ -tocoferol) (GILA-DIAZ *et al.*, 2019). Desses últimos, destacam-se os carotenoides  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, que possuem estrutura molecular semelhante à vitamina A, e os  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol, que são isoformas da vitamina E (MATOS; RIBEIRO; GUERRA, 2015).

A ação antioxidante da vitamina A é responsável por suprir uma forma mais reativa do oxigênio, denominada singlete; e também por neutralizar radicais livres, como os radicais tiol e peroxil (RUTKOWSKI; GRZEGORCZYK, 2012). Segundo Rutkowski e Grzegorzczuk (2012), essas ações ocorrem porque essas moléculas possuem uma ligação dupla entre dois carbonos na cadeia lateral hidrofóbica. Essas ligações competem com os radicais livres protegendo as células dos danos que seriam causados pela oxidação.

A vitamina E, tendo o  $\alpha$ -tocoferol como constituinte de 90% de suas isoformas, apresenta a função de neutralizar as ERO e radicais hidroxil. A ação antioxidante da vitamina E é direcionada, principalmente, a proteção dos lipídios das membranas celulares, como os AGPI, de reações mediadas pelas ERO. Essas funções da vitamina E são muito eficientes para conter o estresse oxidativo, o que a torna o principal antioxidante lipossolúvel (MATOS; RIBEIRO; GUERRA, 2015; RUTKOWSKI; GRZEGORCZYK, 2012).

A transferência placentária das vitaminas A e E durante a gestação é limitada e não supre a necessidade do recém-nascido, sendo o LH a principal fonte desses

nutrientes. Logo, têm-se mais uma característica de grande relevância do LH para o lactente (MATOS; RIBEIRO; GUERRA, 2015).

### **2.1.2 Composição Lipídica do leite humano**

Entre os macronutrientes que compõem o LH, os lipídios são os mais variáveis. Sua concentração no leite ao final da mamada pode ser de duas a três vezes maior que no início. Esses componentes são responsáveis pela saciedade e contribuem com quase metade da energia fornecida pelo leite. Portanto, é importante que a criança esgote uma mama antes de receber a outra, de forma que receba todos os nutrientes que estão contidos no LH, incluindo a porção mais rica em gordura (BRASIL, 2019). Além de contribuir com o suprimento da demanda energética, a fração lipídica do leite também fornece ácidos graxos (AG) importantes e vitaminas lipossolúveis (BRASIL, 2019; BALLARD; MORROW, 2013; CALIL; FALCÃO, 2003).

Da composição lipídica do LH, 98% é constituída pelos triglicerídeos e as propriedades destes são influenciadas pela composição de AG que possuem (KOLETZKO, 2016). Segundo Euclides (2014), entre os principais AG presentes no LH, destacam-se os ácidos palmítico, o principal AG saturado, e os ácidos linoleico e linolênico, precursores dos AGPI de cadeia longa ácido araquidônico (ARA) e ácido decosahexaenóico (DHA), que exercem importante função no desenvolvimento neurológico, visual e imunológico. A importância de DHA e ARA para o desenvolvimento imunológico se deve ao fato de que estes são precursores de prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina e leucotrienos (KOLETZKO, 2016; CALIL; FALCÃO, 2003).

Quanto ao desenvolvimento neurológico e visual, Silva, Júnior e Soares (2007), em um artigo de revisão, destacaram estudos que apontam a relação benéfica da ingestão de AG essenciais por meio da amamentação exclusiva, pois crianças amamentadas demonstram maior capacidade de aprendizado e concentração, melhor acuidade visual e se adaptam melhor à luz. Além dos AG de cadeia longa, são encontrados em menores quantidades os de cadeia curta, uma importante fonte energética e auxiliares na maturação do trato gastrointestinal do lactente (ANDREAS; KAMPMANN; LE-DOARE, 2015).

Os AG estão susceptíveis a alterações químicas durante o processamento e o armazenamento do LH. Dentre essas alterações, a mais frequente é a oxidação lipídica, que resulta na perda do valor nutricional e em alterações sensoriais. Essas reações de oxidação envolvem o oxigênio e os ácidos graxos insaturados (AGI), podendo ocorrer por diferentes mecanismos, sendo eles: fotoxidação, oxidação enzimática ou autoxidação. A fotoxidação é um mecanismo que não envolve a formação de radicais livres e ocorre devido a exposição do alimento à luz, quando há em sua composição moléculas como a mioglobina, a clorofila, riboflavina, entre outras. A oxidação enzimática consiste na degradação dos AGI pela ação da enzima lipoxigenase. A autoxidação é um mecanismo que envolve a formação de radicais livres e pode inviabilizar o consumo do alimento devido a uma alteração nas características sensoriais, conhecida como ranço (ARAÚJO, 2015).

As reações que envolvem os radicais livres, tais como a autoxidação, acontecem em cadeia, pois essas moléculas são muito energéticas e instáveis. A autoxidação acontece em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação, o hidrogênio de um ácido graxo insaturado, que possui uma ligação covalente carbono-hidrogênio mais fraca devido a insaturação, é abstraído e se forma um radical livre que será estabilizado pelo deslocamento da ligação dupla, ocorrendo, nos AGPI, a formação de ligações duplas conjugadas. Esse deslocamento pode formar ligações *cis* ou *trans*. Na etapa de propagação, o radical livre reage com o oxigênio atmosférico formando um radical peroxil. O radical peroxil, sendo muito energético, provoca a abstração de um hidrogênio de um outro ácido graxo insaturado, formando um hidroperóxido e novos radicais livres nesse outro ácido graxo. Dessa forma, a reação se propaga de um ácido graxo para o outro, caracterizando uma reação em cadeia. A fase de terminação ocorre quando há um aumento nas concentrações desses produtos da oxidação e estes reagem entre si, formando produtos estáveis ou não reativos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os hidroperóxidos formados pela oxidação de AGI, na etapa da propagação, podem se segregar e formar radicais acoolxil e esta formação é normalmente seguida pelas reações de  $\beta$ -clivagem, que resultam em produtos de degradação secundária que podem ser voláteis ou não, tais como os aldeídos. Entre os aldeídos voláteis, destaca-se o hexanal como sendo o de maior concentração e um bom indicador da deterioração lipídica dos alimentos, em especial do LH, uma vez que os produtos primários da oxidação dos lipídios são muito instáveis e suas concentrações diminuem

consideravelmente nas etapas mais avançadas da oxidação (ELISIA; KITTS, 2011; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). As consequências da ingestão desses produtos da oxidação lipídica vêm sendo estudadas em modelo animal e têm sido observadas alterações como irritação intestinal, que podem resultar em uma menor absorção de nutrientes e levar a consequências mais graves (NESSEL; KHASHU; DYALL, 2019).

## 2.2 Banco de Leite Humano

A importância do aleitamento materno na diminuição da mortalidade infantil é bem conhecida atualmente, porém, diversos fatores podem impossibilitar uma mulher de amamentar o seu filho. Há situações em que as mães de bebês prematuros e/ou de baixo peso internados em UTIs neonatais tem uma produção de LH insuficiente para a demanda de seus filhos. Nesses casos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a oferta do LH doado, tendo em vista que a ausência da amamentação pode afetar o crescimento e desenvolvimento saudável do bebê (OMS, 2011). Por isso, os BLHs são importantes para que a criança o receba em situações que a mãe não puder amamentar, principalmente em casos de prematuridade.

Os BLHs são unidades que promovem ações de incentivo ao aleitamento materno e são responsáveis por coletar, tratar e distribuir o LH doado para que possa ser ofertado principalmente aos recém-nascidos com baixo peso ao nascer e prematuros internados em UTIs (OMS, 2011; MAIA *et al.*, 2006).

No ano de 1943 foi implantado o primeiro BLH no Brasil, no Instituto Nacional de Puericultura que, atualmente, recebe o nome de Instituto Fernandes Figueira (IFF). Com a finalidade de cuidar de casos como a prematuridade e perturbações nutricionais, o banco coletava e distribuía o LH. Nessa época, o aumento do consumo de produtos industrializados entre lactentes recém desmamados foi responsável por 85% das mortes por desnutrição nessa fase da vida. Com isso, notou-se a necessidade da implantação de um BLH para tentar contornar a situação e atender à essa demanda. Dessa época até o início da década de oitenta, cinco novos bancos foram implantados no Brasil (MAIA *et al.*, 2006).

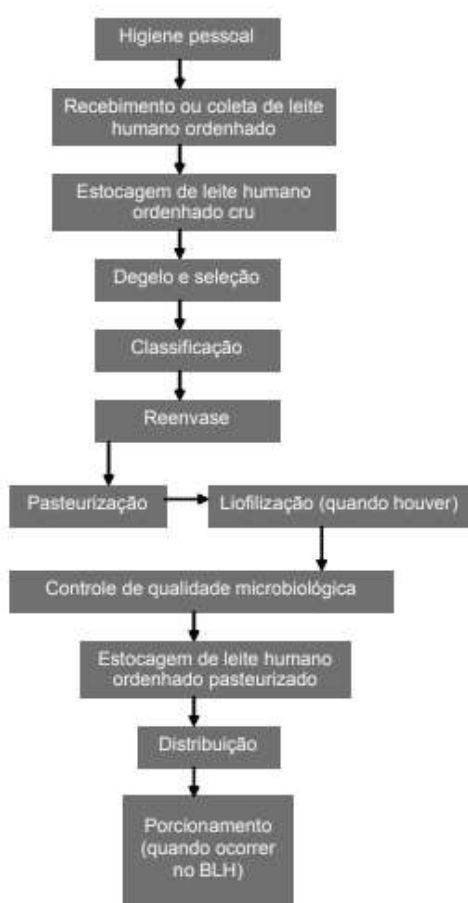
Na fase inicial de implementação dos BLHs até os anos oitenta, a finalidade principal era a coleta do LH. Isso resultou em processos que não consideravam a

decisão da nutriz em doar ou não o leite e chegaram até a profissionalizar a doação por meio da oferta de remunerações, assistência médica diferenciada ou cestas de alimentos às doadoras que conseguiam extrair maior volume de leite. A condição socioeconômica das doadoras, em sua maioria, era baixa, e isso contribuiu para a doação e até mesmo estimulou a gravidez (BRASIL, 2008; MAIA *et al.*, 2006).

A ascensão dos BLHs foi de suma importância para a criação do Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (PNIAM), responsável pela instituição do Grupo Técnico de BLH em 1984 que, por sua vez, criaram o primeiro documento que continha recomendações técnicas voltadas para a implantação e monitoramento dos BLHs, no ano de 1987. Essas recomendações foram o arcabouço para a criação da primeira legislação federal (BRASIL, 1988), publicada em 1988 na forma de portaria, que determinou normas gerais para o funcionamento dos BLHs (BRASIL, 2008; MAIA *et al.*, 2006). Nesse mesmo ano, ocorreu o I Congresso Brasileiro de Bancos de Leite Humano, onde foi lançada a Rede Nacional de Bancos de Leite Humano, hoje denominada Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano. Esses acontecimentos foram de suma importância para consolidar o modelo de gestão dos BLHs naquele momento, bem como para o reconhecimento da função da mulher na amamentação, de forma que a doação do LH fosse realizada com o livre consentimento da doadora e sem qualquer viés, como remunerações e outros (MAIA *et al.*, 2006).

Com a expansão dos BLHs houve a necessidade de publicar uma nova legislação, a RDC/Anvisa nº 171/2006 (BRASIL, 2006). Esse regulamento aborda sobre diversos aspectos, visando um funcionamento seguro e eficaz dos BLHs e Postos de Coleta de Leite Humano (PCLHs), incluindo o processamento do LH até a sua distribuição. A partir dessa legislação foi elaborado o manual Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos (BRASIL, 2008), juntamente com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Atualmente, o tratamento térmico preconizado é a pasteurização lenta, que consiste em submeter o LH a uma temperatura de 62,5 °C por trinta minutos após o pré-aquecimento, monitorando a cada cinco minutos. Esse tratamento possibilita a inativação dos microrganismos patogênicos não esporulados. Após o tratamento, o leite deve ser estocado em uma temperatura máxima de – 3 °C e assim pode permanecer por um tempo máximo de seis meses (BRASIL, 2008). A Figura 1 representa o fluxo de trabalho nos BLHs.

**Figura 1** - Fluxo de trabalho preconizado nos Bancos de Leite Humano do Brasil.



Fonte: BRASIL (2008).

Segundo os dados do site da Rede Nacional de Bancos de Leite Humano, o Brasil conta com 224 BLHs e 217 PCLHs, sendo um modelo para diversos países (rBLH, 2020). Na Europa, 28 países contam com a presença dos BLHs, totalizando 240 (EMBA, 2020). Na América do Norte tem apenas 29 e, na África do Sul, 27 BLHs instalados em hospitais, 2 PCLHs e 1 Banco de Reserva (HMBANA, 2020; SABR, 2020). Diante da função dessas unidades, nota-se a importância de expandir cada vez mais os BLHs em todo o mundo.

### **2.3 Pasteurização e efeitos nas propriedades nutricionais do leite humano**

Nos BLHs, o LH, após ser coletado e aprovado pelos testes de controle de qualidade, é submetido a um tratamento térmico bem reconhecido na área de tecnologia de alimentos, a pasteurização lenta. Esse tratamento visa a eliminação do

microrganismo não esporulado mais termorresistente que, no caso do leite, é a *Coxiella burnetti* (BRASIL, 2008). Dessa forma, foi estabelecido que o LH deve ser pasteurizado a uma temperatura de 62,5 °C por 30 minutos, após o tempo de pré-aquecimento (BRASIL 2006).

A pasteurização, apesar de não esterilizar o leite, é um processamento viável por garantir a redução de grande parte dos microrganismos. Porém, alguns estudos têm demonstrado perdas nutricionais relevantes com esse tratamento e, segundo Borgo *et al.* (2015), é necessário melhorar as condições de armazenamento e processamento nos BLHs, especialmente da pasteurização e do descongelamento para, assim, buscar manter o máximo possível as características nutricionais do LH cru.

Ballard e Morrow (2013) destacam a diminuição significativa na funcionalidade e concentração dos fatores bioativos do LH devido a pasteurização do LH. Desses fatores, destaca-se o  $\alpha$ -tocoferol por ser a principal isoforma da vitamina E encontrada no LH e também por ter a função de proteger os AGPI da oxidação lipídica. Um estudo realizado por Hanson *et al.* (2016) demonstrou que o LH pasteurizado possui uma concentração significativamente menor de tocoferóis quando comparado ao leite cru. Além disso, os níveis de glutatona também tiveram uma diminuição significativa após a pasteurização. É válido ressaltar que estas alterações determinam uma redução da atividade antioxidante total do LH doado. Gila-Diaz *et al.* (2019) também enfatizaram a perda de antioxidantes no LH após a pasteurização e mencionam a declaração da Associação Espanhola de Pediatria sobre a necessidade de novos métodos que melhorem ou preservem as propriedades antioxidantes do LH.

Quanto aos macronutrientes, Vieira *et al.* (2011) observaram que os lipídios são os que mais sofrem alterações em sua concentração após a pasteurização lenta, reduzindo cerca de 5,5%. Isso impacta diretamente no valor calórico, visto que os lipídios são a principal fonte de energia do LH. García-Lara *et al.* (2013) também observaram uma diminuição na concentração dos lipídios e, conseqüentemente, no conteúdo energético. No entanto, a porcentagem média de redução foi um pouco menor em relação ao estudo de Vieira *et al.* (2011), sendo igual a 3,5%.

Quanto à composição lipídica, Romeu-Nadal *et al.* (2008) não observaram uma diferença significativa entre o LH cru e o pasteurizado (62,5 °C por 30 minutos). Moltó-Puigmartí *et al.* (2011) encontraram o mesmo resultado, uma vez que as diferenças nas proporções dos AG entre o leite cru e o pasteurizado não foram estatisticamente



significativas. Em contrapartida, um estudo realizado por Ewaschuk *et al.* (2011) demonstrou algumas modificações significativas na porcentagem relativa dos AG, que consistiram em um aumento dos ácidos láurico (C12:0) e mirístico (C14:0) e diminuição da concentração do ácido oleico (C18:1,  $\omega$ 9). Não foram observadas modificações na concentração dos AGPI de cadeia longa após o tratamento térmico. Borgo *et al.* (2015) também observaram aumento significativo na concentração dos ácidos láurico e mirístico, enquanto que os ácidos esteárico e araquídico tenderam a reduzir. Além destes, o ácido linolênico também apresentou uma concentração significativamente menor no LH pasteurizado.

Uma revisão sistemática, ao analisar o impacto da pasteurização lenta nos nutrientes e compostos bioativos do LH doado, concluiu que apesar do processamento não ter impactado consideravelmente as concentrações de AG, levou a um aumento significativo nas concentrações de ácidos graxos livres (AGL) (PEILA *et al.*, 2016). Gao *et al.* (2019), também em uma revisão, destacaram que pequenas alterações foram observadas nas concentrações dos AG nos estudos avaliados e sugerem que estas ocorreram devido a uma má homogeneização das amostras ou outras variações na metodologia dos estudos analisados.

Também é possível observar o efeito do tratamento térmico nos lipídios por meio de compostos de degradação lipídica. Destes compostos, o hexanal é o que está presente em maior concentração entre os aldeídos voláteis gerados a partir da oxidação lipídica (ELISIA; KITTS, 2011). A pasteurização lenta não alterou significativamente os níveis desses compostos nas amostras analisadas por Elisia e Kitts (2011), no entanto, houve um aumento na concentração do hexanal em duas amostras. Essas amostras também apresentaram uma concentração muito baixa de vitamina C, que é considerada um importante componente antioxidante. Segundo eles, apesar de não ser estatisticamente significativo, isso pode sugerir uma possível correlação. Em um estudo de revisão, Peila *et al.* (2016) ressaltam que, geralmente, as vitaminas hidrossolúveis e a vitamina C são afetadas pela pasteurização, sofrendo uma diminuição significativa em sua concentração. Contudo, é possível perceber a necessidade de deferir os dados disponíveis com a realização de novos estudos, além de buscar por alternativas tecnológicas capazes de melhorar a qualidade do LH doado pasteurizado.

## 2.4 Efeitos do armazenamento na qualidade nutricional do leite humano

O LH doado e pasteurizado pode ser armazenado congelado por até seis meses a uma temperatura máxima de -3 °C (BRASIL, 2006). Nesse sentido, García-Lara *et al.* (2013) reproduziram essa prática habitual dos BLHs e avaliaram o efeito do congelamento (-20 °C por seis meses) no LH pasteurizado. Foi observado uma diminuição significativa nas concentrações dos lipídios e da lactose, bem como uma diminuição do conteúdo energético. Nessel, Khashu e Dyll (2019), em um estudo de revisão, destacaram que o armazenamento aumenta a susceptibilidade dos lipídios à peroxidação e isso impacta na qualidade nutricional do LH doado. Pode-se sugerir que essa maior susceptibilidade ocorra devido a diminuição das concentrações de compostos antioxidantes durante o armazenamento. Outra revisão sistemática demonstra que, aparentemente, há uma diminuição na concentração dos lipídios e um aumento de AGL após o armazenamento (GAO *et al.*, 2019).

Os antioxidantes, segundo Gila-Diaz *et al.* (2019) e Nessel, Khashu e Dyll (2019), são sensíveis ao armazenamento e podem sofrer uma redução em suas concentrações. Em contrapartida, Marinkovic *et al.* (2016) observaram que o armazenamento a -20 °C por 30 dias não afetou a atividade antioxidante do LH pasteurizado, pois a redução dessa atividade ocorreu devido ao tratamento.

Poucos são os estudos sobre o impacto do armazenamento na estabilidade lipídica e nos compostos bioativos do LH doado após o tratamento. Logo, nota-se a necessidade de realizar novos estudos com a finalidade de verificar esses efeitos, tendo em vista que no recém-nascido há um aumento do estresse oxidativo com a mudança do meio intrauterino para o extrauterino e, por isso, apresenta uma demanda maior dos compostos antioxidantes, cuja principal fonte é o LH (MATOS; RIBEIRO; GUERRA, 2015; BERTINO *et al.*, 2018).

## 2.5 Ultrassom no leite humano

Os tratamentos térmicos de pasteurização e esterilização são os mais conhecidos e utilizados atualmente. São processamentos eficientes para a inativação de microrganismos patogênicos e para aumentar a vida útil dos alimentos. No entanto, sabe-se que esses também levam a algumas alterações não somente nas

características sensoriais dos alimentos, mas também nas nutricionais. Atualmente, está cada vez maior a demanda por alimentos com menores interferências do processamento e que ofereçam maiores benefícios à saúde. Aliado a isso, tem-se aumentado a necessidade de desenvolver processos que conservem o máximo das características sensoriais e nutricionais, bem como as propriedades bioativas desses alimentos (KNORR *et al.*, 2011; SORIA; VILLAMIEL, 2010; CAMERON; MCMASTER; BRITZ, 2009; DEMIRDÖVEN; BAYSAL, 2008).

Por ser considerado seguro, confiável e eficiente, o ultrassom se caracteriza como uma tecnologia alternativa para processamentos como a homogeneização, a dispersão e a emulsificação. Devido a isso, vem sendo alvo de pesquisas há alguns anos a fim de determinar seus efeitos sobre a qualidade nutricional e microbiológica dos alimentos (KNORR *et al.*, 2011; DEMIRDÖVEN; BAYSAL, 2008). Segundo Awad *et al.* (2012), o ultrassom foi desenvolvido como uma tecnologia emergente que visa garantir a segurança dos alimentos, mas de forma que o processamento seja minimizado e a qualidade seja potencializada.

O ultrassom consiste em ondas sonoras que superam a audição humana (>16 kHz) (SORIA; VILLAMIEL, 2010; BUTZ; TAUSCHER, 2002). Essa tecnologia pode ser classificada com base em sua faixa de frequência, sendo dividida em baixa intensidade (frequência superior a 100 kHz e intensidade menor que 10 kW/m<sup>2</sup>) ou alta intensidade (frequência entre 18 kHz e 100 kHz e intensidade maior que 10 kW/m<sup>2</sup>) (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). O ultrassom de baixa intensidade é normalmente utilizado para análises dos alimentos durante o processamento e armazenamento, de forma a garantir a qualidade e segurança do produto. Já o de alta intensidade é utilizado para alterar propriedades físico-químicas, com a finalidade de inativar enzimas, gerar emulsões, homogeneizar, promover reações químicas, entre outros (AWAD *et al.*, 2012; DEMIRDÖVEN; BAYSAL, 2009).

As frequências de ultrassom acima de 20 kHz são responsáveis pelas vibrações mecânicas que formam ondas ultrassônicas. Essas ondas, ao se dispersarem em meios líquidos, geram repetidas compressões e descompressões. Esse ciclo pode sobrepor as forças atrativas das moléculas líquidas, formando bolhas que crescem a cada ciclo e, ao explodirem, armazenam energia em pontos quentes, resultando em alta temperatura e pressão que, por sua vez, geram uma alta taxa de cisalhamento e turbulências que resultam no rompimento da membrana e morte celular. Esse fenômeno é chamado de cavitação e a ele é atribuído os efeitos de

inativação de enzimas e microrganismos (CZANK; SIMMER; HARTMANN, 2010; SORIA; VILLAMIEL, 2010; CAMERON; MCMASTER; BRITZ, 2009; BUTZ; TAUSCHER, 2002).

Demirdöven e Baysal (2008) mencionaram que são necessários mais estudos para poder afirmar que o ultrassom é um método alternativo para a conservação dos alimentos, pois este ainda não é suficiente para garantir uma boa qualidade microbiológica quando aplicado isoladamente em alguns alimentos. Porém, Piyasena, Mohareb e McKellar (2003), em uma revisão, afirmaram que o ultrassom combinado a pressão e/ou calor demonstra resultados consideráveis na conservação das características sensoriais e nutricionais dos alimentos que são normalmente submetidos aos tratamentos térmicos como a pasteurização lenta e a esterilização.

O ultrassom utilizado junto ao calor recebe o nome de termossonicação. Khandpur e Gogate (2015) observaram vantagens desse processamento no suco de laranja, pois as características nutricionais do suco após o tratamento estavam muito semelhantes ao suco fresco. Em outro estudo realizado com suco de pera foi observado que a termossonicação não provocou mudanças significativas no pH, nos sólidos solúveis e na acidez total titulável do suco, no entanto, notou-se um aumento significativo na concentração da vitamina C após o tratamento (SAEEDUDDIN *et al.*, 2016). Segundo Nadeem *et al.* (2018), os diversos estudos sobre os efeitos do ultrassom em sucos de diferentes frutas têm demonstrado que esse tratamento, além de inativar microrganismos deteriorantes, aumenta a atividade antioxidante. É provável que isso ocorra devido ao fenômeno da cavitação, pois quando as membranas das células são rompidas, os compostos bioativos ali contidos, como os antioxidantes, estão mais expostos e propensos a interagir com compostos do meio extracelular, como os radicais livres.

Cameron, McMaster e Britz (2009) avaliaram o efeito do ultrassom combinado ao calor no leite de vaca e observaram que, em relação à qualidade microbiológica, esse tratamento pode ser uma alternativa para a pasteurização, pois foi capaz de eliminar os microrganismos patogênicos presentes no leite (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens*). Além disso, não foi observado um impacto negativo nos teores totais de proteína, lipídios e lactose ao utilizar esse tratamento, tornando-o um efetivo meio de processar o leite de vaca sem gerar efeitos indesejáveis, como afetar negativamente a qualidade nutricional. Bermúdez-Aguirre *et al.* (2009), ao estudarem o modelo de inativação da *Listeria innocua* no leite de vaca

utilizando a termossonicação, observaram que seu tempo de processamento é menor e não leva a alterações no pH e nas concentrações de ácido láctico, o que a torna aplicável para pasteurizar e homogeneizar o leite.

Czank, Simmer e Hartmann (2010) analisaram o efeito da termossonicação no LH e foi observado um aumento na taxa de inativação de *E. coli* e *Staphylococcus epidermidis* (99%), quando comparado ao uso apenas do ultrassom (96% e 72%, respectivamente). O menor tempo de tratamento ao utilizar a termossonicação reduz a exposição do LH ao calor e ao ultrassom, podendo conservar melhor as suas características nutricionais e compostos bioativos. Desses compostos, o que recebe maior destaque no LH são os antioxidantes, portanto, reduzir a sua perda durante o processamento e armazenamento pode contribuir para diminuir a degradação lipídica, preservando as características dos AG (GILA-DIAZ *et al.*, 2019). Um estudo realizado por Parreiras *et al.* (2020) demonstrou efeitos positivos do uso da termossonicação na inativação de microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Salmonella*) e no aumento da atividade antioxidante, além de não ter impactado os níveis de retinol do LH. Isso evidencia a possibilidade da termossonicação contornar alguns dos problemas relacionados ao LH doado pasteurizado, como a perda desses componentes que são de suma importância nos primeiros anos de vida da criança.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a atividade antioxidante e a estabilidade lipídica do LH termossonicado após o armazenamento congelado por 120 dias.

#### **3.2. Objetivo Específico**

- Avaliar a estabilidade das isoformas de tocoferol no LH termossonicado após o armazenamento congelado;
- Verificar o impacto do congelamento sobre a atividade antioxidante in vitro do LH termossonicado;
- Analisar os efeitos do armazenamento congelado do LH termossonicado sobre as concentrações de hexanal.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção do leite humano

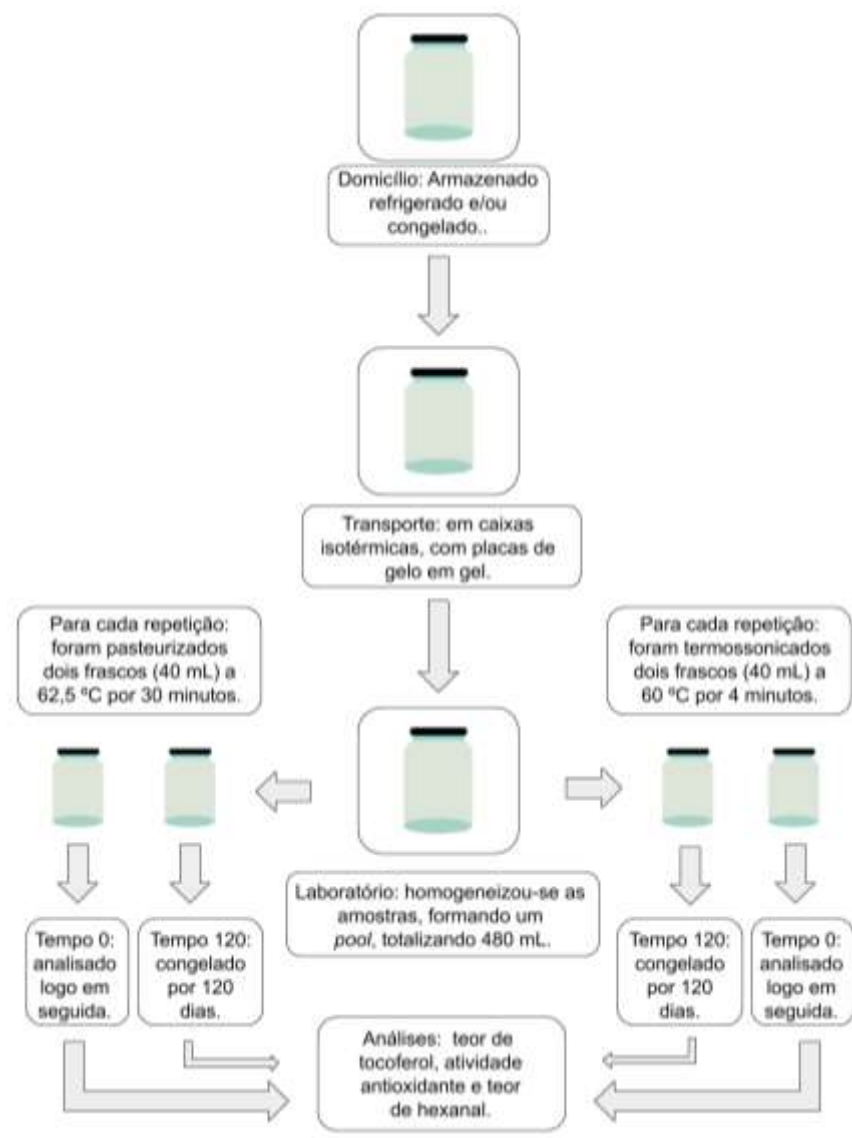
As nutrizes convidadas para participarem do estudo doando o LH foram as doadoras cadastradas no Projeto de Extensão Mãe de Leite da ENUT-PROEX/UFOP, desenvolvido no BLH da Santa Casa da Misericórdia de Ouro Preto, durante os meses de agosto, setembro e outubro de 2019. O contato inicial foi realizado por meio de ligação telefônica e o critério de exclusão adotado foi a doadora ter idade inferior a 20 anos. Cada nutriz realizou a própria extração do LH em seu domicílio, conforme os procedimentos adotados pelo BLH (BRASIL, 2008). Com a finalidade de obter um leite com maior teor de gordura, orientou-se as doadoras a realizarem a extração depois da mamada ou após a retirada manual do leite de início. Os leites extraídos foram armazenados em frascos de vidro transparentes, imediatamente refrigerados a temperatura inferior a 10 °C por até 12 horas e, em seguida, transportados dentro de caixas isotérmicas contendo placas de gelo em gel reutilizáveis para manter a temperatura em cerca de 0 °C. Atendendo aos critérios estabelecidos por Brasil (2008), os leites foram encaminhados imediatamente para a Escola de Nutrição, na Universidade Federal de Ouro Preto, sem ultrapassar seis horas. Em seguida, homogeneizou-se as amostras de LH obtidas, formando um *pool*, que foi utilizado nos tratamentos e repetições estabelecidos no delineamento experimental. O volume total de LH necessário para a execução das análises foi de 480 mL, os quais foram obtidos conforme a disponibilidade das doadoras.

Mediante a anuência da Santa Casa da Misericórdia de Ouro Preto, apresentada no Anexo 1, o projeto de pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto, sob o número de CAAE 82411818.1.0000.5150. Para comprovar o consentimento em participar da pesquisa, as doadoras interessadas leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1).

## 4.2 Delineamento Experimental

Para avaliar o efeito do armazenamento congelado na atividade antioxidante e na estabilidade lipídica do LH termossonicado após 120 dias de armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2$ ) foi avaliado também o LH pasteurizado imediatamente após o processamento e ao final do tempo de armazenamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Determinou-se os seguintes parâmetros: teores de  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\beta$  tocoferóis, atividade antioxidante in vitro pelos métodos de sequestro do radical livre sintético 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e redução do íon ferro (FRAP), e composto de degradação lipídica hexanal (Figura 2).

**Figura 2** - Desenho experimental do estudo.





### 4.3 Processamento do leite humano

#### 4.3.1 Pasteurização Lenta

O processo de pasteurização lenta foi realizado conforme é preconizado no Brasil, de acordo com a RDC/Anvisa nº 171/2006 (BRASIL, 2006). Submeteu-se 40 mL de leite ao tratamento térmico em banho-maria (marca Kacil, modelo BM02) a 62,5 °C por 30 minutos. Agitou-se os frascos a cada cinco minutos, mantendo-os no banho. Para que o ar dissolvido no LH durante esse processo pudesse se desprender, manteve-se os frascos rosqueados com folga de ¼ de volta. Em seguida, resfriou-se os frascos contendo o LH, imergindo-os em um banho de gelo até que atingissem temperatura igual ou abaixo de 5 °C. Após o armazenamento congelado a  $\pm 18$  °C por 120 dias, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 38°C.

#### 4.3.2 Termossonicação

As amostras foram tratadas em um equipamento de banho ultrassônico BRANSONIC, da marca Emerson (modelo CPX 3800H), em uma frequência de 40 khz e potência de 110 W. Utilizou-se uma energia acústica específica de 14,69 mW/mL de LH e a intensidade do ultrassom foi de 1591 mW/cm<sup>2</sup>. O leite (40 mL) foi termossonicado por 4 minutos após atingir a temperatura de 60 °C (PARREIRAS *et al.*, 2020). Assim como recomendado para o processo de pasteurização (BRASIL, 2006), manteve-se uma folga de 1/4 de volta nas tampas dos frascos para o desprendimento do ar dissolvido no LH durante o processo. Em seguida, resfriou-se rapidamente os frascos em um banho de gelo até que alcançasse temperatura igual ou abaixo de 5 °C. Após o armazenamento congelado a  $\pm 18$  °C por 120 dias, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 38°C.

## 4.4 Análises Químicas

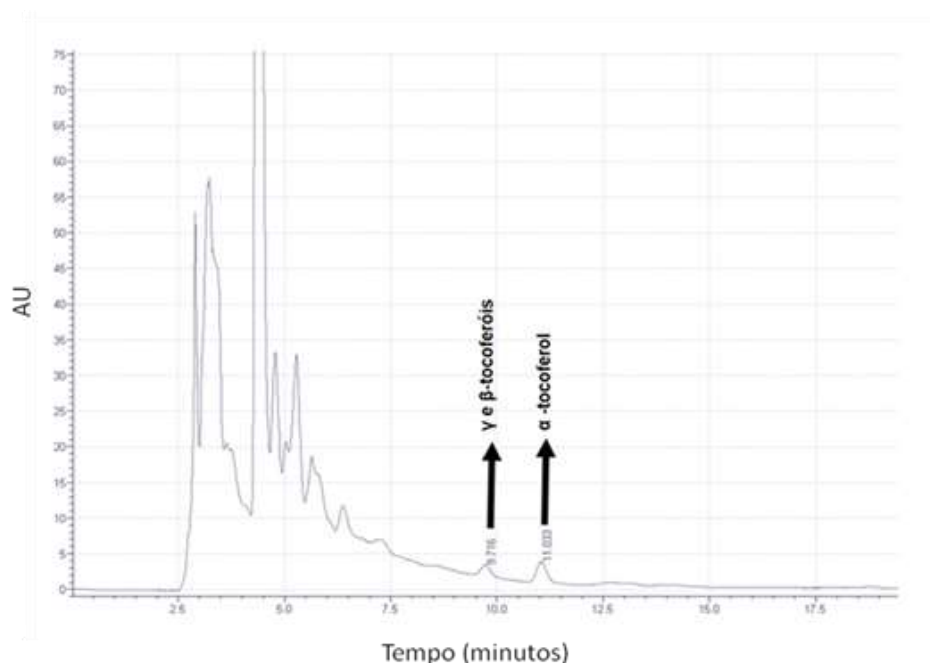
### 4.4.1 Tocoferóis

Para a determinação das isoformas de vitamina E ( $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\beta$  tocoferol) utilizou-se o método de Korchazhkina *et al.* (2006). As amostras de LH foram aquecidas em banho-maria até atingir 38 °C e, em seguida, foram pipetados 1,25 mL de leite em tubos de vidro com tampa de rosca. Também foram adicionados 1,25 mL da solução de metanol com butil-hidroxitolueno (BHT) (0,1%) e 1,25 mL da solução de hidróxido de potássio (KOH) (10%). Homogeneizou-se as amostras em um vórtex por 30 segundos. Após esse processo, as amostras foram mantidas em banho-maria (70 °C) por 15 minutos, agitadas no vórtex novamente e mantidas em banho-maria por mais 15 minutos. As amostras, após serem retiradas do banho, foram inseridas em banho de gelo por 10 minutos e, em seguida, com a adição de uma solução de ácido clorídrico (HCL) 6 M, foram acidificadas até um pH próximo a 2,0. Logo depois, foram acrescentados 5 mL de hexano e, novamente, homogeneizou-se as amostras (três vezes por 20 segundos). Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 246 xg. Transferiu-se para um tubo de vidro o sobrenadante (2 mL) pipetado após a centrifugação, os quais foram evaporados em atmosfera de nitrogênio. Feito isso, os resíduos das amostras foram congelados (-80 °C) para posterior ressuspensão.

Restituiu-se os resíduos utilizando 500  $\mu$ L de solução metanol:isopropano (1:1), agitando-os em um vórtex para a dissolução total das partículas. Em seguida, foi centrifugado a 1.300 rpm por 5 minutos. Posteriormente, foram injetadas alíquotas de 50  $\mu$ L para cada uma das amostras. Utilizou-se o *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC, um método de cromatografia líquida altamente eficiente, para a dosagem dos isômeros de tocoferol. O método foi usado em detector DAD Shimadzu, varredura de 190 a 800 nm, coluna Shim-pack CLC-ODS (C18), 4,6 x 250 mm (Shimadzu), com comprimento de onda de 292 nm e fluxo 1 mL/min de metanol.

Para a realização da curva de calibração foi utilizado o padrão de tocoferóis Sigma Tocopherols – mixed. As concentrações de  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\beta$  tocoferóis identificadas nas amostras foram apresentados por meio de porcentagens relativas em comparação com as concentrações do LH cru. As isoformas  $\gamma$  e  $\beta$  tocoferóis coeluíram no mesmo tempo de retenção e, por isso, foram expressas juntas (Figura 3).

**Figura 3** – Cromatograma evidenciando os picos das isoformas  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\beta$  tocoferol em uma amostra de leite humano.



#### 4.4.2 Análises da atividade antioxidante

##### 4.4.2.1 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Para a determinação da atividade de sequestro do radical livre DPPH, utilizou-se o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com as modificações propostas por Zarban *et al.* (2009). Adicionou-se 1 mL de DPPH em solução de etanol (0,06 mM) em alíquotas contendo 50  $\mu$ L de cada amostra de LH. Fez-se a homogeneização das amostras e estas foram mantidas em repouso em banho-maria por 30 minutos a 37 °C. Após essa etapa, foram acrescentados 0,5 mL de clorofórmio nas amostras, as quais foram centrifugadas por 5 minutos a 8.000 rpm. Fez-se a leitura em um espectrofotômetro (FEMTO 700 S) com comprimento de onda de 517 nm. Para o controle foi utilizada a solução de DPPH em etanol (0,06 mM). O cálculo do percentual de atividade que elimina o radical DPPH foi calculado por meio da equação:

$$\text{Atividade sequestradora (\%)} = \frac{[(\text{Absorbância do controle} - \text{absorbância da amostra}) / \text{Absorbância do controle}] \times 100}{}$$

#### 4.4.2.2 FRAP (Redução do Íon Ferro)

Para a determinação da atividade antioxidante equivalente a redução do ferro (FRAP) utilizou-se a metodologia de Oveisi *et al.* (2010) com algumas modificações. Obteve-se o reagente FRAP por meio da combinação de 25 mL de solução 2,4,6-tri(2- piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM, 25 mL de cloreto férrico 20 mM e 125 mL de tampão acetato. Utilizou-se água destilada para a diluição das amostras de LH nas concentrações de 125 mL/L, 160 mL/L, 250 mL/L, 330 mL/L, 500 mL/L, 660 mL/L e 1000 mL/L. Para cada 25 µL das diluições foram adicionadas 0,750 mL de água destilada e 0,750 mL de solução FRAP. Após estes processos, as amostras foram mantidas em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. Em seguida, leu-se as amostras em espectrofotômetro (FEMTO 700 S) calibrado com a solução FRAP e com comprimento de onda de 593 nm.

Para o cálculo da atividade antioxidante utilizou-se uma curva padrão de Trolox (100, 200, 400, 800, 1200, 1600 e 2000 µmol) e suas porcentagens de inibição correspondentes. Os resultados obtidos foram apresentados em µmol de equivalente Trolox por mililitro (µmol TE/mL).

#### 4.4.3 Hexanal

Para a determinação do hexanal presente nas amostras de LH, realizou-se algumas modificações no método utilizado por Shahidi e Pegg (1994). Vials de 10 mL contendo 5 mL de LH foram mantidos em banho-maria de óleo por 45 minutos a 85 °C. Decorrido esse tempo, utilizou-se uma seringa (Gastight, série 1.000) para extrair 2,5 µL dos voláteis contidos no *head space* do recipiente. O volume extraído foi injetado em um cromatógrafo a gás (VARIAN CP-3380) contendo um detector por ionização em chama e equipado com uma coluna SP-2330 (80% bis (3-cianopropil) e 20% 3-cianopropilfenil polissiloxano) da Supelco Inc., Bellefonte, PA com 30 m x 0,25 mm x 0,2 µm de espessura de filme. Manteve-se a coluna a 50 °C por 5 minutos e, decorrido esse tempo, a temperatura se elevou a uma taxa de 30 °C por minuto até atingir 220 °C, permanecendo assim por mais 5 minutos. O gás transportador utilizado foi o hidrogênio. Após cada injeção dos voláteis, a seringa foi mantida em uma estufa por 15 minutos a uma temperatura de 60 °C, a fim de alcançar a total evaporação dos voláteis que ainda poderiam estar contidos no interior da seringa.

Para cálculo da concentração de hexanal nas amostras foi utilizada uma curva padrão de hexanal (0,0005, 0,001, 0,0015, 0,002 mg/mL de LH), corrigindo as respectivas áreas e tendo em vista a concentração de hexanal que estava presente no LH, que foi a matriz alimentar utilizada para a realização da curva. Os resultados obtidos foram apresentados em  $\mu\text{g}$  de hexanal por mL de LH.

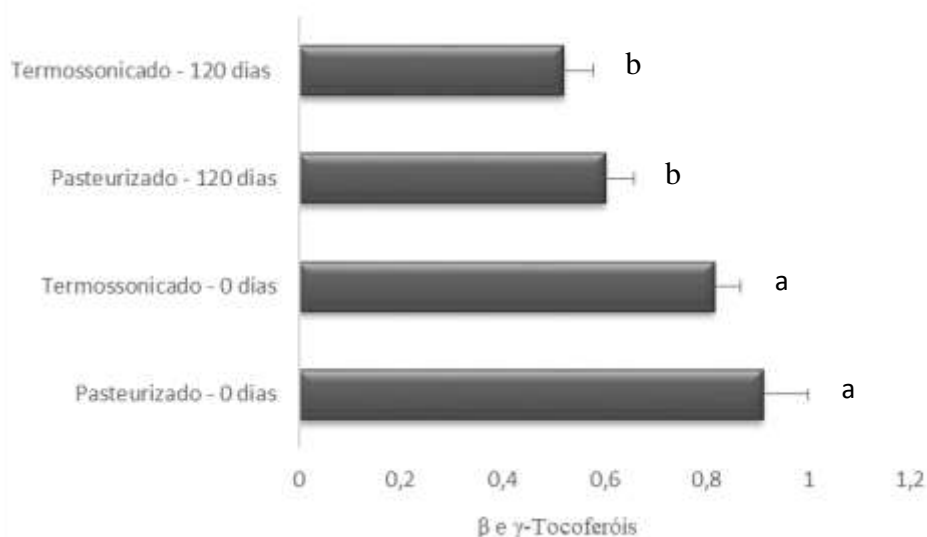
#### **4.5 Análises estatísticas**

Para testar a normalidade dos dados, aplicou-se os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Devido a distribuição normal dos dados, os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey utilizando-se um nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2019).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se o efeito do armazenamento congelado por 120 dias a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2$ ) em amostras de LH termossonicado e as possíveis alterações em sua atividade antioxidante e estabilidade lipídica, em comparação ao LH pasteurizado. Analisou-se as concentrações de  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\beta$  tocoferóis após o processamento e armazenamento congelado. As isoformas  $\gamma$  e  $\beta$  tocoferóis tiveram uma diminuição de 36,5% com a termossonicação e de 34,1% com a pasteurização e essa diferença entre os processamentos não foi significativa (Figura 4).

**Figura 4** – Presença de  $\gamma$  e  $\beta$  tocoferóis nas amostras de leite humano após os processamentos (pasteurização e termossonicação) e armazenamento congelado ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 120 dias

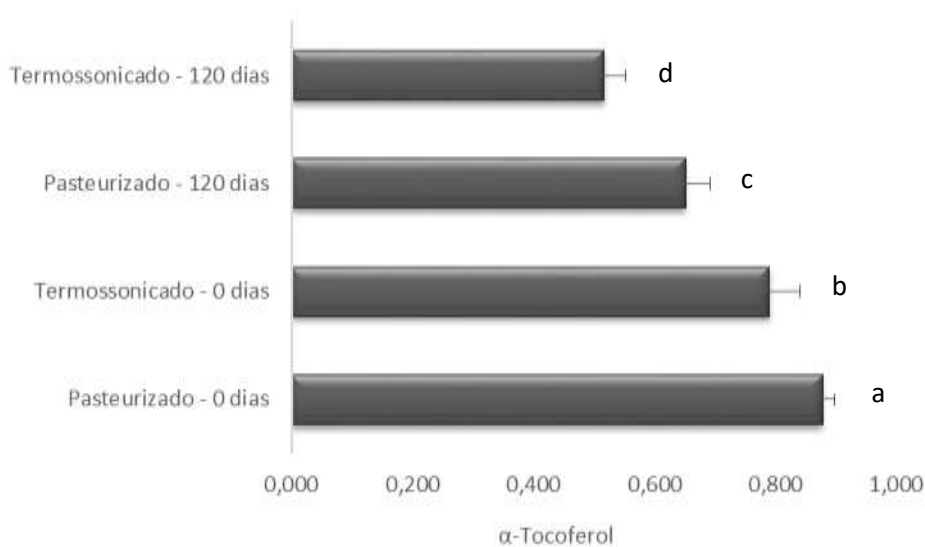


\*Tratamentos seguidos de letras iguais indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

A concentração de  $\alpha$ -tocoferol, a principal isoforma da Vitamina E, também sofreu um decréscimo significativo após o armazenamento congelado. O LH termossonicado apresentou uma redução significativamente maior nas concentrações quando comparado ao LH pasteurizado (Figura 5). No entanto, percebe-se que a concentração de  $\alpha$ -tocoferol também foi significativamente menor no LH termossonicado no tempo 0 (logo após os tratamentos) em relação às amostras pasteurizadas. Após o armazenamento congelado por 120 dias, as perdas de  $\alpha$ -tocoferol foram de 26,1% e 34,2% para o LH pasteurizado e o LH termossonicado,

respectivamente. Ao observarmos esses valores e os resultados no gráfico (Figura 5), podemos sugerir que a principal causa da diferença entre as concentrações de  $\alpha$ -tocoferol nas amostras foi em decorrência das distintas perdas nos processamentos.

**Figura 5** – Presença de  $\alpha$ -tocoferol nas amostras de leite humano após os processamentos (pasteurização e termossonicação) e armazenamento congelado (-18 °C) por 120 dias.



\*Tratamentos seguidos de letras iguais indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Até o momento, não há disponível na literatura estudos que avaliaram os efeitos do armazenamento congelado nas concentrações de tocoferol no LH após a pasteurização e/ou termossonicação. Um estudo realizado por Rastrelli *et al.* (2002) com amostras de azeite, relatou que o  $\alpha$ -tocoferol foi um dos primeiros compostos a serem oxidados durante o armazenamento. Observaram também que a perda foi significativamente menor nos teores de tocoferol em amostras cujos frascos estavam completamente cheios ou quase cheios, enquanto que as amostras armazenadas em garrafas meio vazias apresentaram maiores perdas, pois estavam expostas a maiores teores de oxigênio nesse *headspace*. Nos BLHs os fracos contendo o LH processado são armazenados com o mesmo volume, porém não completamente cheios. Esse mesmo procedimento foi adotado no armazenamento das amostras do presente estudo e, por isso, é possível que a presença desse espaço sem vácuo tenha contribuído com as ocorrências observadas.

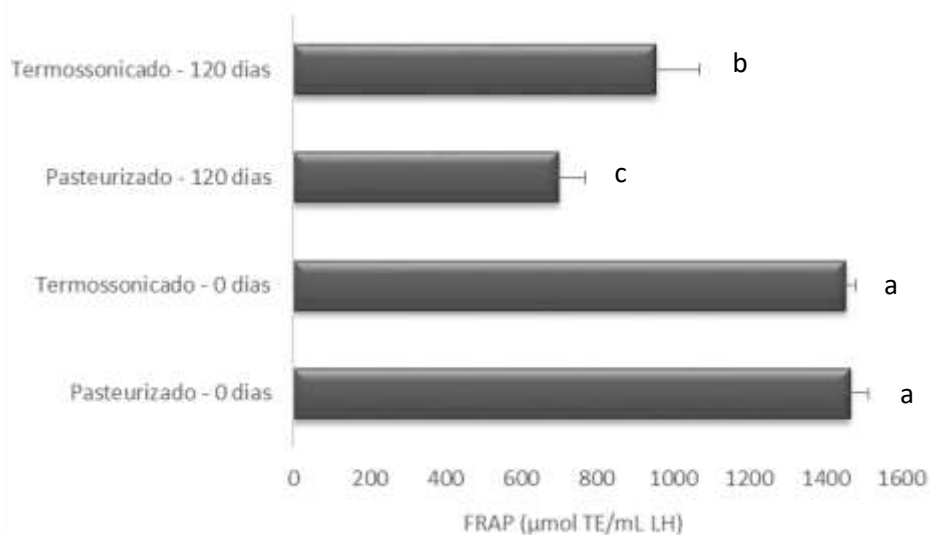
Alguns estudos avaliaram o efeito do armazenamento congelado em amostras de LH cru. Lacomba *et al.* (2012), ao analisarem amostras armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 dias, observaram que a diminuição nas concentrações dos tocoferóis não foi significativa. Outro estudo, realizado por Romeu-Nadal *et al.* (2008), concluiu que as concentrações de  $\alpha$  e  $\gamma$ -tocoferol não demonstraram perda significativa com o armazenamento congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2$ ) por 12 meses. Wei *et al.* (2018) também avaliaram o impacto do congelamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 180 dias nas concentrações de tocoferóis e não observaram perdas significativas. Um estudo de revisão apontou que, com base nas evidências disponíveis, o armazenamento do leite cru não afeta o teor de vitamina E (NESSEL; KHASHU; DYALL, 2019). Hanson *et al.* (2016) realizaram um estudo a fim de analisar o impacto da pasteurização nas concentrações de tocoferóis e observaram uma redução significativa quando comparado ao leite cru. Considerando os desfechos dos estudos mencionados, sugere-se que a diminuição significativa nas concentrações dos tocoferóis observadas no presente estudo foi consideravelmente provocada pelas alterações na matriz alimentar devido aos processamentos de pasteurização e termossonicação. Segundo Soria e Vilamiel (2010), a aplicação da sonicação gera radicais livres muito reativos no meio e, com base nisso, sugere-se que o aumento desses radicais tenha contribuído para a diminuição das concentrações das isoformas de tocoferóis. Além disso, apesar do curto tempo de exposição à sonicação, pode ter ocorrido uma maior exposição desse composto às reações devido ao fenômeno da cavitação. Esse fenômeno consiste na formação de bolhas de gás, que ao sofrerem um colapso, podem desestruturar membranas celulares e expor esses componentes às reações (SORIA; VILLAMIEL, 2010). Tendo em vista que os lipídios estão dispersos no LH na forma de glóbulos, envoltos por uma membrana composta por fosfolipídios e proteínas (SILVA *et al.*, 2007), pode ter ocorrido o rompimento desta e conseqüente exposição dos tocoferóis, que são lipossolúveis.

Além da vitamina E, existem outros compostos que constituem a atividade antioxidante do LH, sendo eles carotenoides, glutathione, glutathione peroxidase, lactoferrina, catalase, vitamina A, vitamina C e outros (HANNA *et al.*, 2004; EUCLYDES, 2014; NESSEL; KHASHU; DYALL, 2019). Por esse motivo, avaliou-se também a atividade antioxidante total do LH termossonicado após o armazenamento pelos métodos FRAP e DPPH. Os dois métodos apresentaram resultados semelhantes (Figuras 6 e 7), sendo observada uma redução significativa na atividade



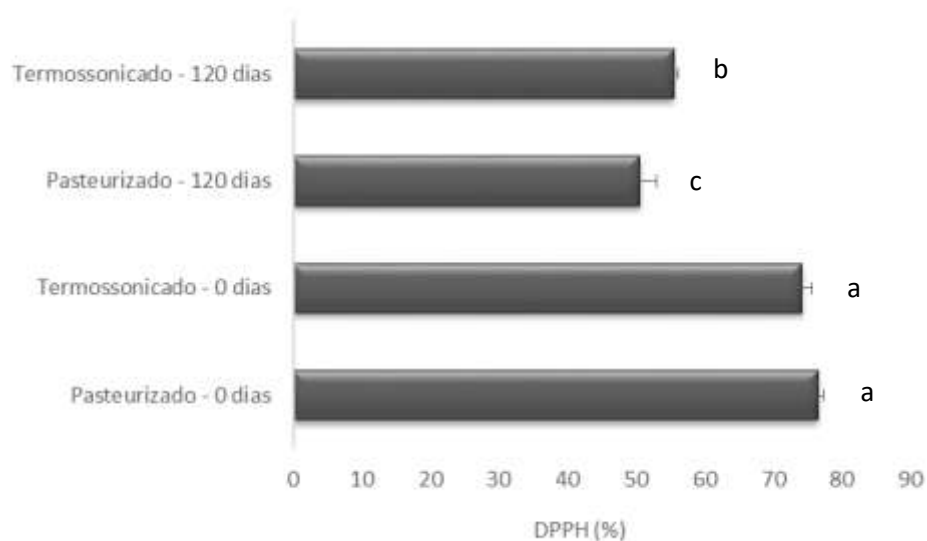
antioxidante do LH processado após o congelamento por 120 dias e as perdas foram significativamente menores no LH termossonicado em relação ao pasteurizado.

**Figura 6** – Atividade antioxidante nas amostras de leite humano após os processamentos (pasteurização e termossonicação) e armazenamento congelado (-18 °C) por 120 dias pelo método FRAP.



\*Tratamentos seguidos de letras iguais indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

**Figura 7** – Atividade antioxidante nas amostras de leite humano após os processamentos (pasteurização e termossonicação) e armazenamento congelado (-18 °C) por 120 dias pelo método DPPH.

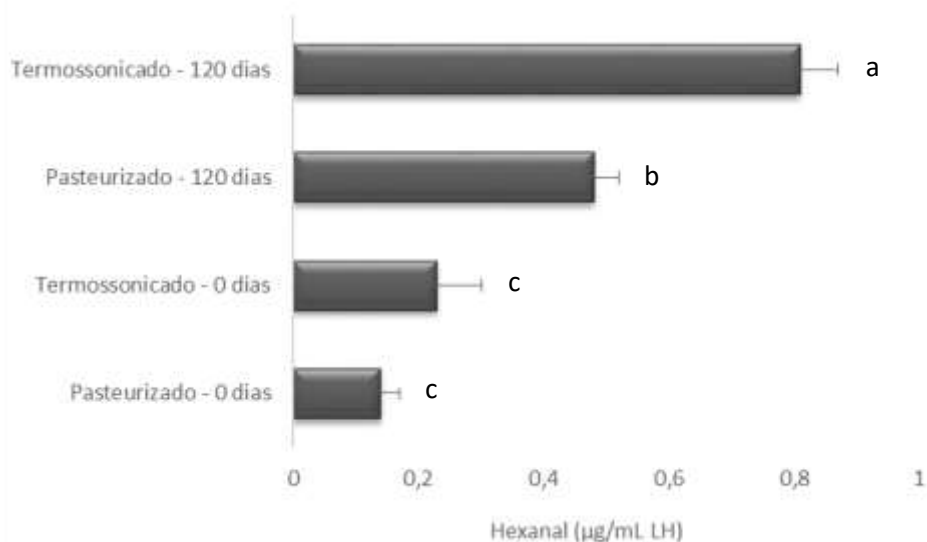


\*Tratamentos seguidos de letras iguais indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Hanna *et al.* (2004) e Aksu *et al.* (2015) avaliaram o efeito do armazenamento congelado no leite cru e utilizaram o método ABTS para a determinação da atividade antioxidante do LH cru congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 7 dias e 14 dias, respectivamente, e observaram uma redução significativa após o congelamento. Em contrapartida, Marinkovic *et al.* (2016), ao avaliarem a atividade antioxidante não enzimática do colostro, observaram que esta não foi significativamente atingida após o armazenamento do LH cru a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 dias. No entanto, este estudo avaliou a atividade antioxidante pelo método ORAC que, segundo o autor, é um método sensível tanto aos antioxidantes de reação rápida como aos de reação lenta, enquanto que o ABTS é um método mais sensível aos antioxidantes de reação rápida, como a vitamina C em sua forma ionizada. A atividade antioxidante no método FRAP é medida através da capacidade de redução férrica da amostra, porém nem todos os antioxidantes possuem essa atividade, como é o caso da glutathiona (CAO; PRIOR, 1998). O método DPPH é um dos mais utilizados para análise da atividade antioxidante em LH, mas sua reação com os compostos antioxidantes se dá de forma mais lenta. Os estudos mencionados avaliaram amostras de leite cru e por um tempo de armazenamento muito menor, então é possível que o processamento e o maior tempo de armazenamento tenham influenciado na atividade antioxidante desses compostos. Além disso, as diferenças nos métodos utilizados para identificar a atividade antioxidante no LH já mencionadas também dificultam a comparação dos resultados.

Com a finalidade de observar os efeitos do armazenamento congelado na estabilidade lipídica do LH após o processamento, foram realizadas análises das concentrações de hexanal, que é um produto secundário da degradação do ácido linoleico (ômega-6) e, segundo Elisia e Kitts (2011), é o aldeído volátil mais abundante no LH, o que o torna um bom indicador da oxidação lipídica. No tempo 0 não houve diferenças significativas nas concentrações desse composto quanto ao processamento, sugerindo que os tratamentos se equivalem quanto ao impacto na estabilidade lipídica quando o LH não é submetido ao armazenamento (Figura 8). Decorridos os 120 dias de armazenamento congelado, foi observado um aumento nas concentrações de hexanal, que foi significativamente maior no leite termossonicado.

**Figura 8** – Presença de hexanal nas amostras de leite humano após os processamentos (pasteurização e termossonicação) e armazenamento congelado (-18 °C) por 120 dias.



\*Tratamentos seguidos de letras iguais indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Até o momento, apenas um estudo avaliou os efeitos do armazenamento congelado (-18 °C por 3, 4, 5 e 6 meses) na estabilidade lipídica do LH cru com base nas concentrações de hexanal e observaram um aumento significativo desse composto após os 3 meses de congelamento (VANGNAI *et al.*, 2017). Silvestre *et al.* (2010) observaram um aumento nas concentrações de malondialdeído (MDA), que também é um produto secundário da oxidação lipídica e marcador de estresse oxidativo, após 60 dias de armazenamento congelado (-20 °C e -80 °C) do LH cru. Ao realizar um estudo avaliando os efeitos do armazenamento congelado nos macronutrientes do LH após a pasteurização, García-Lara *et al.* (2013) observaram que os lipídios foram os que apresentaram maiores perdas em sua concentração (2,8%). Como foi observado nos estudos mencionados, podemos sugerir que o aumento das concentrações de hexanal com o armazenamento congelado independe se o LH foi processado ou não. A pasteurização, a termossonicação e o armazenamento congelado expõem o LH a fatores que podem contribuir para uma maior formação desses compostos de degradação lipídica, como o calor, a sonicação, a presença de oxigênio e outros.

O LH termossonicado apresentou uma concentração significativamente maior de hexanal. Esse efeito pode ter ocorrido devido ao fenômeno da cavitação que, ao

ocasionar o rompimento dos glóbulos de gordura, expôs os AG às reações de oxidação lipídica. Além disso, houve um aumento dos radicais livres no meio, gerados pela sonicação, que possivelmente resultou na diminuição do  $\alpha$ -tocoferol. Uma vez que a principal função dos tocoferóis é proteger os AGPI da oxidação lipídica (MATOS; RIBEIRO; GUERRA, 2015), as perdas nas concentrações desse composto podem ter contribuído consideravelmente com o aumento nas concentrações de hexanal. Além disso, Silvestre et al. (2010) observaram que a atividade antioxidante da enzima glutathiona peroxidase era mínima após o armazenamento congelado (-20 °C) do leite cru por 60 dias. Pode-se sugerir que o armazenamento congelado também tenha reduzido a atividade antioxidante desta enzima no presente estudo, contribuindo assim com a maior formação desses compostos de degradação, visto que a glutathiona é um antioxidante primário responsável por inibir a autooxidação nas etapas de iniciação e propagação.

O presente estudo fornece dados importantes quanto ao uso da termossonicação como uma alternativa à pasteurização lenta do LH doado nos BLHs, mas requer a realização de novas investigações que avaliem mais profundamente esses efeitos. Buscar por tecnologias que conservem ao máximo as características nutricionais do LH, garantindo a sua qualidade microbiológica, não é somente contribuir com a melhoria dos procedimentos nos BLHs, mas promover a nutrição dos recém-nascidos prematuros e de baixo peso nas UTIs neonatais. É válido ressaltar que mesmo com as perdas de alguns constituintes após o processamento, o LH doado contém maiores concentrações desses e outros compostos quando comparado à fórmula infantil, sendo ainda o mais recomendado quando há uma impossibilidade da mulher amamentar (HANSON *et al.*, 2016).

## 6. CONCLUSÃO

A aplicação da termossonicação no LH no presente estudo evidenciou que, após o armazenamento congelado por 120 dias, as concentrações de  $\gamma$ ,  $\beta$  e  $\alpha$  tocoferóis apresentaram reduções semelhantes em relação ao LH pasteurizado após o congelamento. Já, a atividade antioxidante avaliada pelos métodos FRAP e DPPH teve menor redução no LH termossonicado após o congelamento. Em contrapartida, verificamos maior formação de hexanal nas amostras de LH termossonicadas após o congelamento. Tais efeitos podem estar relacionados a diferentes alterações na matriz alimentar em decorrência dos dois tipos de processamento distintos. A maior atividade antioxidante total do LH termossonicado após os 120 dias de congelamento é um incentivo à realização de novos estudos que avaliem esses efeitos, incluindo outros métodos. A termossonicação já demonstrou ser uma tecnologia alternativa promissora na inativação de microrganismos e, com este estudo, evidenciou que pode ser uma alternativa à pasteurização lenta nas condições avaliadas. É indispensável a efetivação de novas investigações que avaliem os efeitos da termossonicação nestes e em outros constituintes do LH.

## REFERÊNCIAS

- ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; LE-DOARE, K. M. Human breast milk: a review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**, v. 91, n. 11, p. 629-635, 2015.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 6. ed. Viçosa: UFV, p. 9-78, 2015.
- AKSU, T. *et al.* The effects of breast milk storage and freezing procedure on interleukine-10 levels and total antioxidant activity. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 28, n. 15, p. 1799-1802, 2015.
- AWAD, T. S. *et al.* Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. **Food research international**, v. 48, n. 2, p. 410-427, 2012.
- BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 49-74, 2013.
- BERTINO, E. *et al.* Donor Human Milk: Effects of Storage and Heat Treatment on Oxidative Stress Markers. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, n. 253, p. 1-5, 2018.
- BORGO, L. A. *et al.* Are fat acids of human milk impacted by pasteurization and freezing? **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, n. 3, p. 1386-1393, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Programas Especiais. **Normas gerais para Bancos de Leite Humano**. Brasília: Ministério da Saúde, 1988.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite Humano**. Brasília: Diário Oficial da União, 2006.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2008.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Departamento de Promoção da Saúde. **Guia alimentar para crianças brasileiras menores de 2 anos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Emerging technologies: chemical aspects. **Food Research International**, v. 35, p. 279-284, 2002.
- BZIKOWSKA, A. *et al.* Correlation between human milk composition and maternal nutritional status. **Rocz Panstw Zakl Hig In English**, v. 69, n. 4, p. 363-367, 2018.

CALIL, V.M.L.T.; FALCÃO, M.C. Composição do leite humano: o alimento ideal. **Revista de Medicina**, v. 82, n. 1-4, p. 1-10, 2003.

CAMERON, M.; MCMASTER, L. D.; BRITZ, T. J. Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. **Dairy Science & Technology**, v. 89, n. 1, p. 83-98, 2009.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1309-1315, 1998.

CZANK, C.; SIMMER, K.; HARTMANN, P. Simultaneous pasteurization and homogenization of human milk by combining heat and ultrasound: effect on milk quality. **Journal of Dairy Research**, n. 77, v. 2, p. 1-7, 2010.

DAMODARAN, S; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 155- 174.

DEMIRDÖVEN, A.; BAYSAL, T. The Use of Ultrasound and Combined Technologies in Food Preservation. **Food Reviews International**, v. 25, n.1, p. 1-11, 2008.

ELISIA, I.; KITTS, D. D. Quantification of hexanal as an index of lipid oxidation in human milk and association with antioxidant components. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 49, n. 3, p. 147-152, 2011.

EMBA. **European Milk Bank Association**. Disponível em: <https://europeanmilkbanking.com/>. Acesso em: 22 fev. 2020.

EUCLYDES, M. P. **Nutrição do lactente**: base científica para uma alimentação saudável. UFV, 2014.

EWASCHUK, J. B. *et al.* Effect of pasteurization on selected immune components of donated human breast milk. **Journal of Perinatology**, v. 31, n. 9, p. 593, 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

GAO, C. *et al.* Changes to breast milk fatty acid composition during storage, handling and processing: A systematic review. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 146, p. 1-10, 2019.

GARCÍA-LARA, N. R. *et al.* Effect of Freezing Time on Macronutrients and Energy Content of Breastmilk. **Breastfeeding Medicine**, v. 7, n. 4, p. 295-301, 2012.

GARCÍA-LARA, N. R. *et al.* Effect of Holder pasteurization and frozen storage on macronutrients and energy content of breast milk. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 377-382, 2013.

GEORGE, A. D. *et al.* Human milk lipidomics: current techniques and methodologies. **Nutrients**, v. 10, n. 1169, p. 1-20, 2018.

GILA-DIAZ, A. *et al.* A Review of Bioactive Factors in Human Breastmilk: A Focus on Prematurity. **Nutrients**, v. 11, n. 1307, p. 1-23, 2019.

HANNA, N. *et al.* Effect of storage on breast milk antioxidant activity. **Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition**, v. 89, p. f518-f520, 2004.

HANSON, C. *et al.* A Comparison of Nutritional Antioxidant Content in Breast Milk, Donor Milk, and Infant Formulas. **Nutrients**, v. 8, n. 681, p. 1-9, 2016.

HMBANA. **Human Milk Banking Association of North America**. Disponível em: <https://www.hmbana.org/find-a-milk-bank/>. Acesso em: 22 fev. 2020.

KHANDPUR, P.; GOGATE, P. Effect of novel ultrasound based processing on the nutrition quality of different fruit and vegetable juices. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 125-136, 2015.

KNORR, D. *et al.* Emerging technologies in food processing. **Food Science and Technology**, v. 2, p. 203–238, 2011.

KOLETZKO, B. Human Milk Lipids. **Annals of Nutrition e Metabolism**, Munich, v. 69, n. 2, p. 28-40, 2016.

KORCHAZHKINA, O. *et al.* HPLC with UV detection for measurement of vitamin E in human milk. **Acta Chromatographica**, v. 16, p. 48-57, 2006.

LACOMBA, R. *et al.* Stability of fatty acids and tocopherols during cold storage of human milk. **International Dairy Journal**, v. 27, n. 1-2, p. 22-26, 2012.

MAIA, P. R. S.; ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R.; SILVA, D. A. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano: gênese e evolução. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, n. 3, p. 285-292, 2006.

MARINKOVIC, V. *et al.* Antioxidative Activity of Colostrum and Human Milk: Effects of Pasteurization and Storage. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 901-906, 2016.

MATOS, C.; RIBEIRO, M.; GUERRA, A. Breastfeeding: Antioxidative properties of breast milk. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, n. 3, p. 169-180, 2015.

MIMOUNI, F.B. *et al.* Preterm Human Milk Macronutrient and Energy Composition: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Clinics in Perinatology**, v. 44, n. 1, p. 165-172, 2017.

MOLTÓ-PUIGMARTÍ, C. *et al.* Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 697-702, 2011.



NADEEM, M.; UBAID, N.; QURESHI, T. M.; MUNIR, M.; MEHMOOD, A. Effect of ultrasound and chemical treatment on total phenol, flavonoids and antioxidant properties on carrot-grape juice blend during storage. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 45, p. 1-6, 2018.

NESSEL, I.; KHASHU, M.; DYALL, S. C. The effects of storage conditions on long-chain polyunsaturated fatty acids, lipid mediators, and antioxidants in donor human milk - A review. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 149, p. 8-17, 2019.

Organização Mundial de Saúde. **Guidelines on optimal feeding of low birth-weight infants in low- and middle-income countries**. Genebra: OMS, 2011.

OVEISI, M. R. *et al.* Human Breast Milk Provides Better Antioxidant Capacity than Infant Formula. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 445-449, 2010.

PARREIRAS, P. M. *et al.* Effect of thermosonication on microorganisms, the antioxidant activity and the retinol level of human milk. **Food Control**, v. 113, p. 1-9, 2020.

PEILA, C. *et al.* The Effect of Holder Pasteurization on Nutrients and Biologically-Active Components in Donor Human Milk: A Review. **Nutrients**, v. 8, n. 477, p. 1-19, 2016.

PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; MCKELLAR, R. C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 207-216, 2003.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RASTRELLI, L. *et al.* Rate of Degradation of  $\alpha$ -Tocopherol, Squalene, Phenolics, and Polyunsaturated Fatty Acids in Olive Oil during Different Storage Conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 5566-5570, 2002.

rBLH. **Rede de Bancos de Leite Humano Brasil**. Disponível em: <https://rblh.fiocruz.br/rblh-brasil>. Acesso em: 20 jan. 2020.

ROMEU-NADAL, M. *et al.* Effect of pasteurisation on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 434-438, 2008.

RUTKOWSKI, M.; GRZEGORCZYK, K. Adverse Effects of Antioxidative Vitamins. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 25, n. 2, p. 105-121, 2012.

SAEEDUDDIN, M. *et al.* Physicochemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of sonicated pear juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 7, p. 1552-1559, 2016.

SABR. **South African Breastmilk Reserve**. Disponível em: <https://www.sabr.org.za/about.html>. Acesso em: 22 fev. 2020.

SHAHIDI, F.; PEGG, R. B. Hexanal as an Indicator of Meat Flavor Deterioration. **Journal of Food Lipids**, v. 1, n. 3, p. 177-186, 1994.

SILVA, R.C. *et al.* Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico químicas de sua gordura. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p.1535-1538, 2007.

SILVA, D. R. B.; JÚNIOR, P. F. M.; SOARES, E. A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, n. 2, p. 123-133, 2007.

SILVESTRE, D. *et al.* Frozen Breast Milk at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$ : A Longitudinal Study of Glutathione Peroxidase Activity and Malondialdehyde Concentration. **Journal of Human Lactation**, v. 26, n. 1, p. 35-41, 2010.

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science e Technology**, v. 21, n. 7, p. 323-331, 2010.

VANGNAI, K. *et al.* Oxidative Stability of Human Breast Milk During Freeze-Storage. **Italian Journal Food Science**, p. 120-125, 2017.

VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S. **Ultrassom na indústria de alimentos: Aplicações no processamento e conservação**. Atena Editora, 2018.

VIEIRA, A. A. *et al.* Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. **Early Human Development**, v. 87, n. 8, p. 577-580, 2011.

WEI, W. *et al.* Tocopherols in human milk: Change during lactation, stability during frozen storage, and impact of maternal diet. **International Dairy Journal**, v. 84, p. 1-5, 2018.

ZARBAN, A. *et al.* Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Human Colostrum, Transitional and Mature Milk. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 45, n. 2, p. 150-154, 2009.

## ANEXO 1 - Carta de Anuência

### Carta de Anuência e Concordância

(Elaborado de acordo com a Resolução 466/2012-CNS/CONEP)

Eu, Marcelo Sergio Gonçalves de Oliveira, provedor da Santa Casa da Misericórdia de Ouro Preto – MG, ciente dos objetivos e da metodologia da pesquisa intitulada “**Ultrassom como alternativa para pasteurização do leite humano: aspectos microbiológicos e nutricionais**”, ciente, ainda, de que trata-se da Dissertação de Mestrado a ser apresentada pela aluna Paola Machado Parreiras, RG: 14.593.571 SSP-MG ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, sob orientação e responsabilidade da professora Dra. Camila Carvalho Menezes, RG: 11.186.262 SSP-MG, do Departamento de Alimentos da UFOP e coorientação das professoras Dra. Maria Cristina Passos, RG: 15.878.728-6 SSP-SP, do Departamento de Nutrição Clínica e Social da UFOP e Dra. Luciana Rodrigues da Cunha, RG: 11.961.612 SSP-MG do Departamento de Alimentos da UFOP, concedo a anuência para seu desenvolvimento, desde que me sejam assegurados os requisitos abaixo:

- O cumprimento das determinações éticas da Resolução nº466/2012 CNS/CONEP;
- A garantia de solicitar e receber esclarecimentos antes, durante e depois do desenvolvimento da pesquisa;
- Não haverá nenhuma despesa para esta instituição que seja decorrente da participação dessa pesquisa;
- No caso do não cumprimento dos itens acima, a liberdade de retirar minha anuência a qualquer momento da pesquisa sem penalização alguma.


Ouro Preto, 19 de janeiro de 2018.

  
Marcelo Sergio Gonçalves de Oliveira

Marcelo S. Gonçalves de Oliveira  
Provedor  
Irmãdada da Santa Casa da  
Misericórdia de Ouro Preto

## APÊNDICE 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE**



Você está sendo convidada para participar como voluntária de uma pesquisa. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, você deverá assinar este documento em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizada de forma alguma.

*Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com as pesquisadoras, Camila Carvalho Menezes nos telefones (coordenadora) (31) 98887-2233/3559-1819, Maria Cristina Passos no telefone (31) 99182-0714 e Janaina Aparecida Vieira Nogueira (32) 99125-6826, inclusive a cobrar. O Comitê de Ética em Pesquisa/UFOP poderá esclarecer questionamentos quanto aos aspectos éticos da pesquisa, por meio do telefone (31) 3559-1368.*

**INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA**

A pesquisa intitulada “ULTRASSOM COMO ALTERNATIVA PARA PASTEURIZAÇÃO DO LEITE HUMANO: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E NUTRICIONAIS” tem por objetivo avaliar se o leite humano tratado com ultrassom apresenta uma qualidade nutricional melhor que o leite tratado com a pasteurização lenta em banho-maria, que é realizada em Bancos de Leite Humano, e como essa qualidade será mantida durante o armazenamento congelado, visto que a pasteurização lenta leva a perdas de alguns nutrientes importantes para a saúde do bebê. Portanto, para observar a diminuição ou não dessas substâncias no leite humano após o ultrassom e a pasteurização, sua participação na pesquisa será a doação de até 200mL do seu leite, os quais podem ser obtidos durante vários dias e armazenados no congelador da sua casa até as pesquisadoras do projeto buscarem, não necessitando nenhum deslocamento de sua parte.

Participando desse estudo você estará ajudando a melhorar a qualidade do leite humano do Banco de Leite e, assim, possibilitará o oferecimento aos prematuros e crianças com algum tipo de vulnerabilidade que não podem obter o leite da própria mãe, a receberem um leite de melhor qualidade para proteger a saúde desses bebês e proporcionar o seu desenvolvimento adequado.

Você não sofrerá nenhum tipo de punição relacionada ao resultado da pesquisa e os dados oriundos da sua participação serão utilizados apenas para os fins propostos no estudo.

Esclarecemos que toda pesquisa envolve um risco inerente. Neste caso, o risco potencial é considerado baixo, uma vez que não implica em adoção de um procedimento que não seja rotineiro para a doação de leite. No entanto, reconhecemos a possibilidade de risco de constrangimento frente à possibilidade de não conseguir ordenhar a quantidade necessária no momento agendado. Caso isto ocorra, as pesquisadoras deixarão você bem à vontade para agendar uma nova data para coleta. Além disso, como é feito no Banco de Leite Humano rotineiramente, nós ligaremos para você antes de retornar à sua casa, para sabermos se será possível fazer a coleta. Em relação ao momento da coleta, ao identificar qualquer sinal de complicação na mama, encaminharemos você ao Banco de Leite Humano para atendimento, como já é feito rotineiramente durante o processo de doação.

Não haverá despesas na sua participação na pesquisa e também não haverá nenhum tipo de ressarcimento, pagamento ou gratificação financeira. Todos os dados coletados serão mantidos em sigilo respeitando a sua privacidade e ficarão arquivados na ENUT/UFOP sob responsabilidade da pesquisadora responsável por 5 anos e logo após serão incinerados. Os dados obtidos serão de uso específico para os propósitos da pesquisa.

E seu direito negar-se a responder qualquer pergunta do questionário e *checklist*, recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

Os resultados da pesquisa, sendo favoráveis ou não, serão apresentados em forma de dissertação de mestrado, e serão divulgados em eventos científicos e na forma de publicação de artigo científico em periódico indexado na área, sempre preservando a identidade e a privacidade das participantes.

\_\_\_\_\_  
CAMILA CARVALHO MENEZES

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA**

Eu, \_\_\_\_\_, RG/CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do mencionado estudo intitulado "ULTRASSOM COMO ALTERNATIVA PARA PASTEURIZAÇÃO DO LEITE HUMANO: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E NUTRICIONAIS". Fui devidamente informada e esclarecida pelas pesquisadoras sobre os procedimentos da pesquisa, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento, se for o caso).

Local e data: \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura: \_\_\_\_\_