

Impacto da congelação do Leite Humano de Dadora no valor nutricional ao longo do tempo – Estudo Piloto

Impact of Human Donor Milk freezing on its nutritional value over time – Pilot Study

Vitória Mendes Barroso Fernandes Botelho

**ORIENTADO POR: PROF^a DOUTORA DIANA MARIA VELOSO E SILVA
COORIENTADO POR: PROFESSOR DOUTOR PEDRO ALEXANDRE AFONSO DE SOUSA MOREIRA E Dra. SUSANA MARIA GONÇALVES FRAGA**

**TRABALHO DE INVESTIGAÇÃO
1.º CICLO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO | UNIDADE CURRICULAR ESTÁGIO
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

TC

PORTO, 2024



Resumo

Introdução: Quando a produção de leite materno é insuficiente e a amamentação não se encontra disponível, o leite humano de dadora pasteurizado (LHDP) é recomendado como alternativa para alimentação de bebês prematuros. Deste modo, é imperativo o seu processamento de forma a garantir a sua segurança. No entanto, estes processos são dispendiosos, e podem alterar a sua composição nutricional.

Objetivos: Avaliar o impacto da congelação no valor nutricional do LHDP ao longo de 12 meses de armazenamento.

Metodologia: Estudo observacional que envolveu a utilização da “*Lactoteca*” do Banco de Leite Humano do Norte. Foram selecionadas 145 amostras de LHDP congelado, correspondentes aos intervalos de tempo congelação selecionados (≤ 1 mês, > 1 mês ≤ 2 meses, > 2 meses ≤ 3 meses, > 3 meses ≤ 6 meses, > 6 meses ≤ 8 meses, > 8 meses ≤ 12 meses). Analisou-se o teor de proteína verdadeira, proteína total, gordura total, hidratos de carbono e valor energético total. Realizaram-se testes de diferenças entre grupos.

Resultados: Foi possível observar um aumento significativo do teor de hidratos de carbono em T1 ($p=0,001$), T3 ($p=0,002$), T4 ($p<0,001$), T5 ($p<0,001$) e T6 ($p<0,001$), uma diminuição significativa do teor de gordura total em T3 ($p=0,001$) e T5 ($p=0,026$), um aumento significativo das proteínas verdadeiras ($p<0,001$) e proteínas totais ($p=0,002$) em T1, e um aumento significativo do valor energético total em T6 ($p<0,001$).

Conclusão: A congelação teve impacto na composição nutricional do LHDP, destacando-se o aumento do teor de hidratos de carbono ao longo do tempo de

congelamento. Constatou-se a necessidade de realizar mais estudos nesta área, de forma a avaliar a possibilidade de alargar o tempo de congelamento do LHDP.

Palavras-Chave: leite humano de dadora pasteurizado, congelamento, banco de leite humano, valor nutricional, tempo de congelamento.

Abstract

Introduction: When breast milk production is insufficient and breastfeeding is not available, pasteurized donor human milk (LHDP) is recommended as an alternative for feeding premature babies. Therefore, it is imperative that it be processed in order to ensure its safety. However, these processes are expensive, and can affect your nutritional composition.

Objectives: Evaluate the impact of freezing on the nutritional value of LHDP over 12 months of storage.

Methodology: Observational study that involved the use of the "Lactoteca" of the Human Milk Bank of the North. A total of 145 frozen LHDP samples were selected, corresponding to the selected freezing time intervals (≤ 1 month, > 1 month ≤ 2 months, > 2 months ≤ 3 months, > 3 months ≤ 6 months, > 6 months ≤ 8 months, > 8 months ≤ 12 months). True protein, total protein, total fat, carbohydrates and total energy value were analyzed. Tests for differences between groups were performed.

Results: It was possible to observe a significant increase in carbohydrate content in T1 ($p=0.001$), T3 ($p=0.002$), T4 ($p<0.001$), T5 ($p<0.001$) and T6 ($p<0.001$), a significant decrease in total fat content in T3 ($p=0.001$) and T5 ($p=0.026$), a significant increase in true proteins ($p<0.001$) and total proteins ($p=0.002$) in T1, and a significant increase in total energy value in T6 ($p<0.001$).

Conclusion: Freezing had an impact on the nutritional composition of the LHDP, highlighting the increase in carbohydrate content over the freezing time. There is a need for further studies in this area in order to assess the possibility of extending the freezing time of the LHDP.

Key Words: pasteurized human donor milk, freezing storage, Human Milk Bank, nutritional value, time of freezing storage.

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

BLH - Banco de Leite Humano

BLHN - Banco de Leite Humano do Norte

LHD - Leite Humano de Dadora

LHDC - Leite Humano de Dadora Cru

LHDP - Leite Humano de Dadora Pasteurizado

MIRIs HMA TM - Miris Human Milk Analyzer TM

NEC - Enterocolite Necrosante

OMS - Organização Mundial de Saúde

Sumário

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos	v
Sumário	vi
Introdução.....	1
Objetivos	3
Metodologia	4
Resultados.....	7
Discussão	10
Pontos Fortes e Limitações	13
Conclusões	15
Referências	16

Introdução

O leite humano é considerado o alimento *gold standard* do recém-nascido devido à sua composição nutricional e componentes bioativos, sendo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) o aleitamento materno exclusivo até aos 6 meses, e como complemento da alimentação a partir dos 6 meses até aos 2 anos. Desta forma, a amamentação é reconhecida como a melhor forma de nutrir um recém-nascido e de promover a sua sobrevivência, destacando o seu poder imunológico e de desenvolvimento, que são indubitavelmente importantes na proteção do organismo, funções cognitivas e sistema gastrointestinal ^(1, 2, 3, 4, 5).

A prevalência de prematuridade (idade gestacional < 37 semanas) e extrema prematuridade (idade gestacional < 28 semanas) têm vindo a aumentar a nível mundial, estimando-se 15 milhões de nascimentos por ano. Este novo paradigma cria assim um novo desafio para a nutrição neonatal, que terá um papel decisivo no crescimento e desenvolvimento adequados destes bebés ^(6, 7, 8).

Desta forma, o leite materno é a opção ideal para alimentar estes recém-nascidos, conferindo proteção contra enterocolite necrosante (NEC), sépsis e outras infeções, retinopatia da prematuridade e displasia broncopulmonar, diminuindo o risco de morte e promovendo o desenvolvimento neurocognitivo e saúde cardiovascular a longo prazo. Para além disso, o leite humano é capaz de combater de forma mais eficaz o stress oxidativo e possíveis danos no DNA, comparativamente às fórmulas infantis. ^(6, 9)

No que diz respeito à composição nutricional do leite humano, destacam-se, em particular, a proteína com efeito antibacteriano e funções imunológicas, como as imunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, e enzimas gastrointestinais como a lipase,

os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa essenciais para o desenvolvimento do cérebro e da retina, os probióticos cruciais no sistema gastrointestinal e as vitaminas, nomeadamente o tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C) com poder antioxidante, fulcrais no combate ao stress oxidativo causado pelas infeções respiratórias e gastrointestinais. Para além disso, está evidenciado que a amamentação tem efeitos benéficos na saúde psicológica e no desenvolvimento do vínculo mãe-bebé ^(1, 6, 7, 10,11).

No entanto, a produção de leite insuficiente é três vezes superior em mães de prematuros, do que em mães de bebés de termo, por razões fisiológicas como desenvolvimento incompleto das glândulas mamárias, e má resposta hormonal, psicológicas e, por vezes, devido a doença ou medicação. Nestes casos, quando a amamentação não é possível, o leite humano de dadora (LHD) é a melhor opção, estando associado a uma baixa taxa de mortalidade e morbilidade, e por isso a um melhor prognóstico, comparativamente ao leite de fórmula, fornecendo os nutrientes adequados, especialmente importantes para estes recém-nascidos, onde o seu fornecimento foi interrompido prematuramente ^(12, 13).

Atualmente, o LHD é processado antes de ser utilizado para alimentação dos prematuros, sendo imperativo passar por pasteurização e congelação para limitar o crescimento de microorganismos patogénicos, garantindo a segurança microbiológica. Nos Bancos de Leite Humano (BLH), em geral, o leite é congelado a -20°C, submetido a pasteurização Holder (aquecido a 62,5°C por 30 minutos, seguido de arrefecimento rápido), e armazenado congelado a uma temperatura de -20°C por tempo não superior a 3 meses antes e após pasteurização. Todavia, todos estes processos, refrigeração, ciclos de congelação e descongelação, pasteurização, entre outros, podem destruir ou diminuir significativamente

elementos protetores do LHD, assim como propriedades nutricionais e biológicas, e a microbiota. Ainda não é claro o efeito exato do tempo de congelação na composição do Leite Humano de Dadora Pasteurizado (LHDP), dado que entre os vários BLH existe uma diversidade nos procedimentos de congelação, que abrange tempos de armazenamento entre 3 e 12 meses ^(6, 10, 14).

Para além disso, o processamento e armazenamento do LHD é um processo dispendioso. O reconhecimento de que um tempo de congelação mais longo reduziria o desperdício de LHDP fora da validade, pelo Banco de Leite Humano do Norte (BLHN), levou à necessidade de determinar se o tempo de congelação do mesmo poderia ser alargado para além dos 6 meses a partir da data da primeira extração, sem comprometer a sua qualidade nutricional, que terá um papel fundamental em assegurar o crescimento e desenvolvimento infantil. Deste modo, o presente estudo pretende avaliar a qualidade nutricional do Leite Humano de Dadora ao longo de 12 meses¹⁴.

Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o impacto da congelação no valor nutricional do LHD ao longo do tempo.

Como objetivos específicos:

- 1) Analisar os lotes de LHDP congelado ao longo de 12 meses (≤ 1 mês, > 1 mês ≤ 2 meses, > 2 meses ≤ 3 meses, > 3 meses ≤ 6 meses, > 6 meses ≤ 8 meses, > 8 meses ≤ 12 meses);
- 2) Explorar a existência de diferenças significativas entre a análise inicial pós pasteurização e a análise posterior pós tempo de congelação, ao nível da

composição nutricional do LHDP, incluindo proteína verdadeira e proteína total, gordura, hidratos de carbono e valor energético total;

3) Testar a possibilidade de aumentar o tempo de congelação do LHDP para além dos 6 meses de armazenamento (pré e pós pasteurização) com qualidade nutricional.

Metodologia

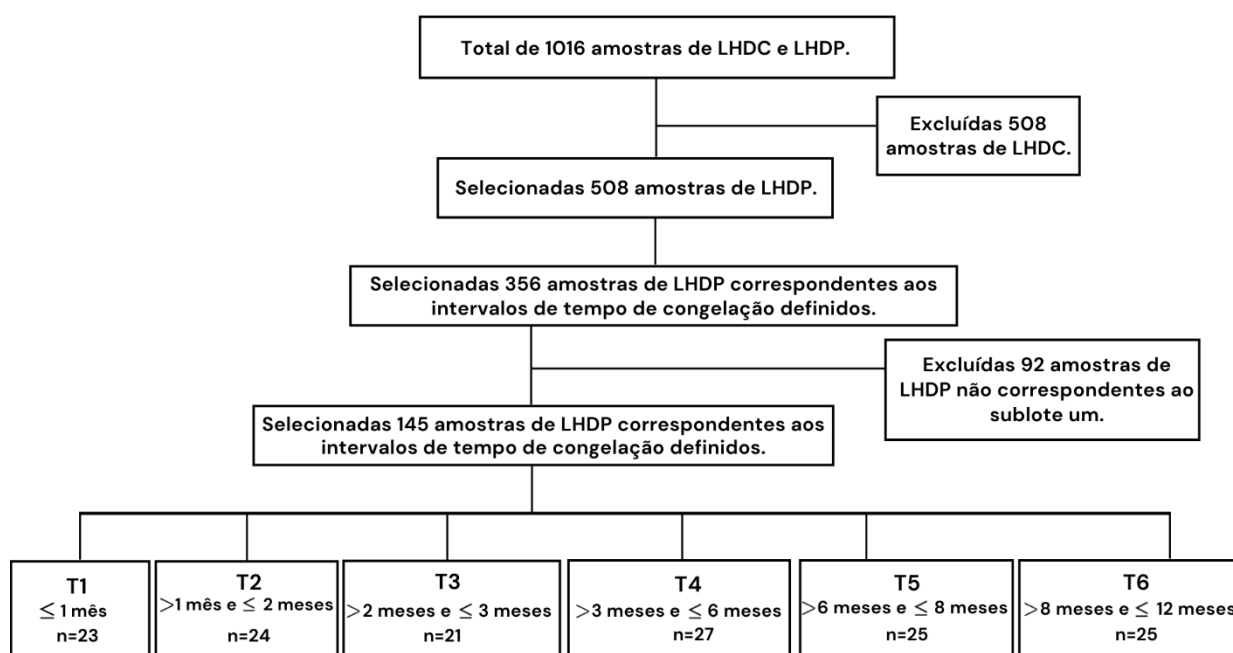
Tipo de estudo

Este trabalho consiste num estudo observacional realizado entre fevereiro e abril de 2024.

Seleção da amostra

Este estudo envolveu a consulta da “*Lactoteca*” do BLHN, constituída por 1016 amostras de Leite Humano de Dadora Cru (LHDC) e LHDP, correspondentes a 101 dadoras, desde 20 de setembro de 2022 até 30 abril de 2024.

O processo de recolha consistiu em selecionar inicialmente as amostras de LHDP e seguidamente identificar, de acordo com os intervalos de tempo de congelação definidos (T1, T2, T3, T4, T5, T6 - ver esquema 1), os lotes de LHDP que pertenciam a cada intervalo de tempo de armazenamento congelado. Para além disso, procedeu-se à eliminação das amostras que correspondiam a vários sublotes do mesmo lote, incluindo apenas LHDP do sub lote um. Desta forma, identificaram-se 264 amostras de LHDP, e procedeu-se apenas à análise de 145 amostras de LHDP, devido à falta de tempo para tratar todos os lotes selecionados.



Esquema 1 - Diagrama de seleção da amostra

Preparação da amostra

A preparação das amostras de LHDP realizou-se de acordo com os procedimentos implementados no BLHN. O leite materno foi extraído pelas dadoras nas suas casas através de uma bomba ou de forma manual para frascos de polipropileno esterilizados fornecidos pelo BLHN, devidamente identificados, e armazenado a uma temperatura $\leq -5^{\circ}\text{C}$. Seguidamente, o LHDC foi recolhido por uma transportadora e armazenado a uma temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ no BLHN, por no máximo 3 meses até ao processamento.

Nas 24h anteriores à pasteurização, o LHDC foi descongelado no frigorífico a uma temperatura de $4-5^{\circ}\text{C}$. Foi realizado o *pooling* dos vários frascos de LHDC de uma mesma dadora, correspondentes a uma doação (lote), sob fluxo laminar e submetido a pasteurização Holder (aquecido a $62,5^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, seguido de arrefecimento rápido). Após a pasteurização, o LHDP foi inserido num banho termostático de 40°C , colocado em *ependorfs* de 5ml, homogeneizado através de

um processador ultrassónico por 8 segundos (*MIRIs Ultrasonic Processor*) e foi realizada a análise nutricional quantitativa pós pasteurização (T0), e o restante foi congelado a uma temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e armazenado na “*Lactoteca*”. Posteriormente, as amostras correspondentes ao T1, T2, T3, T4, T5, T6 de congelação foram descongeladas, aquecidas, homogeneizadas e analisadas.

Análise da amostra

O aparelho MIRIs HMATM (Human Milk Analyzer, Miris AB, Uppsala, Sweden) foi utilizado para analisar as amostras. Este aparelho determina o valor em gramas de proteína verdadeira (aminoácidos totais), proteína total (quantidade total de azoto proteico e não proteico, multiplicado pelo fator de conversão 6,25), gordura e hidratos de carbono e o valor energético total numa única leitura. O instrumento foi pré-calibrado pelo fabricante e internamente calibrado de forma regular durante a sua utilização de acordo com as recomendações do fabricante, usando uma solução denominada MIRIs Check. Esta calibração foi realizada a cada 10 análises de LHDP. Procedeu-se, inicialmente, à lavagem do aparelho, com água destilada e MIRIs Cleaner (solução de detergente), e por fim à calibração, com injeção da solução MIRIs Check. É de salientar que todas as soluções supracitadas permanecem em banho termoeestático a 40°C durante a sua utilização. Seguidamente, foram utilizadas soluções denominadas MIRIs 1 e MIRIs 2 de composição nutricional conhecida, que tal como as amostras de LHDP, foram aquecidas, homogeneizadas e analisadas, de forma a verificar se o aparelho estava a analisar de forma correta. A injeção destas amostras apenas se realiza uma vez, depois da primeira calibração, não sendo necessário a sua repetição nas seguintes calibrações.

Tratamento e análise de dados

A estatística descritiva dos dados foi efetuada através do cálculo das medianas e percentis (P25; P75) das amostras de cada intervalo de tempo de congelação. Utilizou-se o teste de Wilcoxon para comparar ordens médias de amostras emparelhadas não paramétricas. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi realizada no programa IBM® SPSS® Statistics for Windows, versão 27.0.1.0.

Resultados

Foram analisadas 145 amostras de LHDP correspondentes a 60 dadoras. A distribuição do valor de proteína verdadeira, proteína total, gordura e hidratos de carbono do LHDP congelado ao longo de 1 ano pós-pasteurização, desde T1 a T6, encontra-se representada no Gráfico 1 e a distribuição do valor energético total no Gráfico 2. Foi possível observar que a composição nutricional e o valor energético total do LHDP não se alteraram significativamente ao longo do tempo de congelação, verificando-se que o valor nutricional se mantém visualmente linear, com o aumentar dos meses de armazenamento.

Gráfico 1 - Distribuição do valor proteína verdadeira, proteína total, gordura e hidratos de carbono durante 12 meses de congelação (Mediana). **Legenda:** g - gramas; ml - mililitro; PV - proteína verdadeira; PT - proteína total; G - gordura; HC - hidratos de carbono; T1 - ≤ 1 mês (n=23); T2 - > 1 mês ≤ 2 meses (n=24); T3 - > 2 meses ≤ 3 meses (n=21); T4 - > 3 meses ≤ 6 meses (n=28); T5 - > 6 meses ≤ 8 meses (n=25); T6 - > 8 meses ≤ 12 meses (n=25).

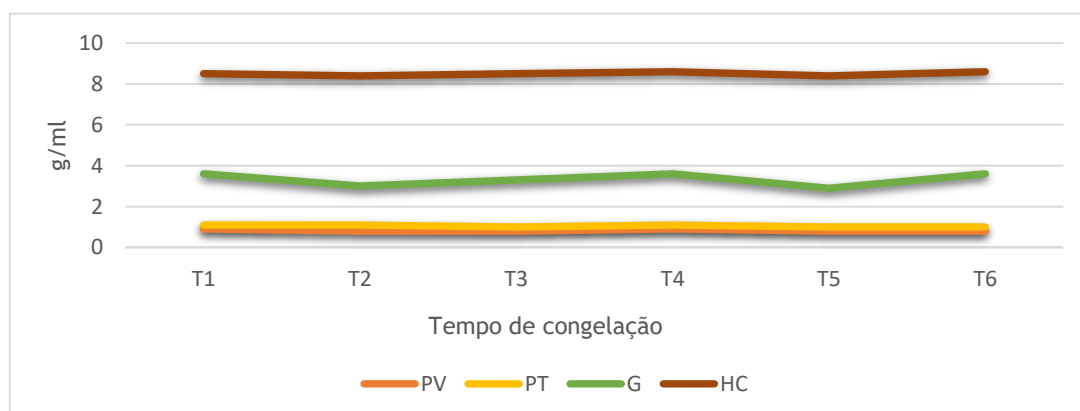
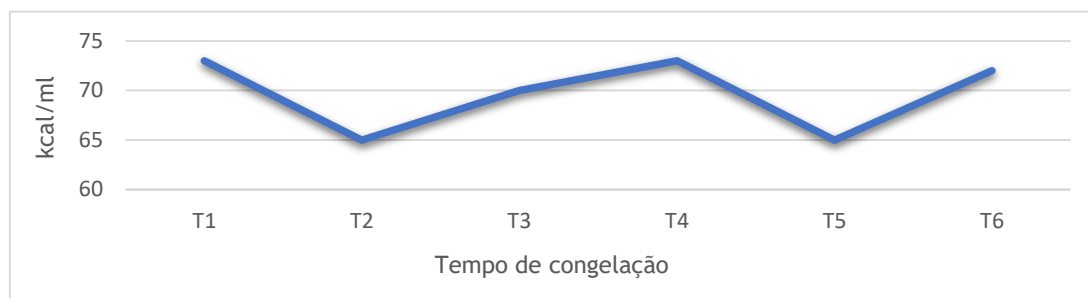


Gráfico 2 - Distribuição do valor energético total durante 12 meses de congelação (Mediana). **Legenda:** kcal-quilocalorias; ml - mililitro; **T1** - ≤ 1 mês (n=23); **T2** - > 1 mês ≤ 2 meses (n=24); **T3** - > 2 meses ≤ 3 meses (n=21); **T4** - > 3 meses ≤ 6 meses (n=28); **T5** - > 6 meses ≤ 8 meses (n=25); **T6** - > 8 meses ≤ 12 meses (n=25).



A avaliação da existência de diferenças significativas ao nível dos macronutrientes e valor energético total, entre análise inicial pós pasteurização (T0) e a análise posterior pós tempo de congelação (**T1** - ≤ 1 mês, **T2** - > 1 mês ≤ 2 meses, **T3** - > 2 meses ≤ 3 meses, **T4** - > 3 meses ≤ 6 meses, **T5** - > 6 meses ≤ 8 meses, **T6** - > 8 meses ≤ 12 meses) são descritas nas Tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6. Verificou-se que, ao nível do teor de proteína verdadeira, apenas existem diferenças significativas em T1 ($p<0,001$), com um aumento de 12,5%. Em relação às proteínas totais, observou-se um aumento significativo ($p=0,002$) de 10,0% em T1. Relativamente ao valor de hidratos de carbono, verificaram-se diferenças significativas em T1 ($p=0,001$), T3 ($p=0,002$), T4 ($p<0,001$), T5 ($p<0,001$) e T6 ($p<0,001$), tendo se verificado um aumento do seu teor ao longo do tempo de armazenamento, correspondendo a 2,4%, 3,7%, 5,5%, 5,0%, 7,5%, respetivamente. Verificou-se que, existem diferenças significativas, ao nível do teor de gordura total, em T3 ($p=0,001$) e T5 ($p=0,026$), justificada pela diminuição do seu valor, correspondente a 6,0% e 10,3%, respetivamente. Em relação ao valor energético total, apenas se observou um aumento estatisticamente significativo em T6 ($p<0,001$), de 7,5%. Constatou-se, ainda, que LHDP congelado a > 1 mês ≤ 2 meses (T2), não apresenta diferenças estatisticamente significativas na sua composição em relação a T0. A média de diferença do teor em hidratos de carbono e gordura, entre o momento

imediatamente após a pasteurização (T0) e no final de > 6 meses ≤ 8 meses (T5), é de 0,4g /ml e 0,9g/ml, respectivamente.

Tabela 1 - Estudo das diferenças entre as variáveis em estudo referentes à informação nutricional do LHDP congelado após pasteurização (T0) e analisado após ≤ 1 mês de congelamento (T1) (n=23). **Legenda:** g - gramas; ml - mililitro; P - percentil.

	T0	T1	
	Mediana (P25-P75)		Valor de p*
Valor Energético Total (kcal/ml)	72,0 (63,0-80,0)	73,0 (61,0-83,0)	0,474
Proteína Verdadeira (g/ml)	0,8 (0,7-0,9)	0,9 (0,8-1,0)	<0,001
Proteína Total (g/ml)	1,0 (0,9-1,2)	1,1 (1,0-1,2)	0,002
Gordura (g/ml)	3,7 (2,7-4,4)	3,6 (2,5-4,5)	0,154
Hidratos de Carbono (g/ml)	8,3 (8,2-8,5)	8,5 (8,4-8,6)	0,001

*Teste Wilcoxon

Tabela 2 - Estudo das diferenças entre as variáveis em estudo referentes à informação nutricional do LHDP congelado após pasteurização (T0) e analisado após > 1 mês ≤ 2 meses de congelamento (T2) (n=24). **Legenda:** g - gramas; ml - mililitro; P - percentil.

	T0	T2	
	Mediana (P25-P75)		Valor de p*
Valor Energético Total (kcal/ml)	67,0 (56,75-72,5)	65,0 (57,25-72,25)	0,775
Proteína Verdadeira (g/ml)	0,8 (0,7-0,9)	0,85 (0,78-1,0)	0,138
Proteína Total (g/ml)	1,0 (0,9-1,13)	1,1 (0,98-1,2)	0,265
Gordura (g/ml)	3,05 (1,90-3,75)	2,95 (1,95-3,65)	0,107
Hidratos de Carbono (g/ml)	8,4 (8,3-8,53)	8,4 (8,3-8,6)	0,497

*Teste Wilcoxon

Tabela 3 - Estudo das diferenças entre as variáveis em estudo referentes à informação nutricional do LHDP congelado após pasteurização (T0) e analisado após > 2 meses ≤ 3 meses de congelamento (T3) (n=21). **Legenda:** g - gramas; ml - mililitro; P - percentil.

	T0	T3	
	Mediana (P25-P75)		Valor de p*
Valor Energético Total (kcal)	70,5 (61,5-75,75)	70,0 (60,25-75,75)	0,317
Proteína Verdadeira (g)	0,8 (0,7-0,9)	0,8 (0,7-0,9)	0,439
Proteína Total (g)	1,0 (0,9-1,18)	1,0 (0,9-1,1)	0,108
Gordura (g)	3,5 (2,63-4,18)	3,3 (2,4-3,88)	0,001
Hidratos de Carbono (g)	8,2 (8,1-8,3)	8,5 (8,7-8,4)	0,002

*Teste Wilcoxon

Tabela 4 - Estudo das diferenças entre as variáveis em estudo referentes à informação nutricional do LHDP congelado após pasteurização (T0) e analisado após > 3 meses ≤ 6 meses de congelamento (T4) (n=28). **Legenda:** g - gramas; ml - mililitro; P - percentil.

	T0	T4	
	Mediana (P25-P75)		Valor de p*
Valor Energético Total (kcal/ml)	73,0 (61,25-84,75)	72,5 (64,25-83,5)	0,033
Proteína Verdadeira (g/ml)	0,9 (0,8-0,9)	0,9 (0,8-0,9)	0,377
Proteína Total (g/ml)	1,1 (1,0-1,1)	1,1 (1,0-1,1)	0,821
Gordura (g/ml)	3,8 (2,58-4,98)	3,6 (2,7-4,58)	0,285
Hidratos de Carbono (g/ml)	8,15 (8,03-8,2)	8,6 (8,5-8,7)	<0,001

*Teste Wilcoxon

Tabela 5 - Estudo das diferenças entre as variáveis em estudo referentes à informação nutricional do LHDP congelado após pasteurização (T0) e analisado após > 6 meses ≤ 8 meses de congelação (T5) (n=25). **Legenda:** g - gramas; ml - mililitro; P - percentil.

	T0	T5	
	Mediana (P25-P75)		Valor de p*
Valor Energético Total (kcal/ml)	66,0 (62,0-74,5)	65,0 (62,0-72,5)	0,930
Proteína Verdadeira (g/ml)	0,8 (0,7-0,9)	0,8 (0,7-0,95)	0,752
Proteína Total (g/ml)	1,0 (0,85-1,15)	1,0 (0,85-1,2)	0,721
Gordura (g/ml)	3,2 (2,7-4,1)	2,9 (2,55-3,7)	0,026
Hidratos de Carbono (g/ml)	8,0 (7,9-8,1)	8,4 (8,3-8,6)	<0,001

*Teste Wilcoxon

Tabela 6 - Estudo das diferenças entre as variáveis em estudo referentes à informação nutricional do LHDP congelado após pasteurização (T0) e analisado após > 8 meses ≤ 12 meses de congelação (T6) (n=25). **Legenda:** g - gramas; ml - mililitro; P - percentil.

	T0	T6	
	Mediana (P25-P75)		Valor de p*
Valor Energético Total (kcal/ml)	67,0 (63,0-73,0)	72,0 (63,5-77,0)	<0,001
Proteína Verdadeira (g/ml)	0,8 (0,7-1,0)	0,8 (0,7-0,9)	0,593
Proteína Total (g/ml)	1,0 (0,8-1,2)	1,0 (0,9-1,15)	0,542
Gordura (g/ml)	3,4 (2,95-4,05)	3,6 (2,75-4,05)	0,985
Hidratos de Carbono (g/ml)	8,0 (7,8-8,1)	8,6 (8,4-8,7)	<0,001

*Teste Wilcoxon

Discussão

Nos BLH, o LHD, antes de ser fornecido ao prematuro, é submetido a congelação e pasteurização, para que este esteja completamente inócuo, cumprindo as regras de segurança alimentar, onde se incluem as análises microbiológicas antes e depois da pasteurização. Todavia, o LHD não é equivalente ao leite humano “fresco”, visto que o processamento (ciclos de descongelação e congelação, pasteurização, entre outros), além de destruir microrganismos patogénicos, também afeta a composição nutricional. Além disso, o tempo de congelação do LHDP é um ponto crítico, que irá influenciar o conteúdo em macronutrientes e valor energético total ¹⁵.

Neste contexto, e tratando-se de um estudo observacional, foi analisado o efeito do tempo de congelação na composição nutricional do LHD durante 1 ano pós-pasteurização, e os resultados demonstraram que o armazenamento do LHDP a -

18°C por 12 meses não resultou em perdas nutricionais significativas, sendo que as diferenças observadas no teor de proteína, gordura e valor energético total são variáveis e não constantes.

No estudo de Waard M et al ⁽¹⁴⁾ é descrito que durante 8 meses de congelação, tempo que os autores constatarem ser seguro microbiologicamente, se verificou um aumento significativo de 13,4% do teor de proteína (0,12g/100ml), justificado pela homogeneização subótima das amostras. No presente trabalho, os resultados não mostram diferenças significativas no valor da proteína, quando analisados os valores correspondentes ao intervalo de tempo T5 (> 6 meses ≤ 8 meses). Apenas foi observado um aumento da proteína verdadeira (12,5%) e proteína total (10,0%) em amostras correspondentes a T1 (≤ 1 mês). No entanto, este aumento não foi constante ao longo do tempo de congelação, não se verificando alterações a este nível em intervalos de tempo de congelação superiores (T2, T3, T4, T5, T6). Este resultado possivelmente se deverá, tal como os autores do estudo supracitado ⁽¹⁴⁾ referem, à homogeneização subótima das amostras, visto que a congelação provoca a destabilização das micelas de caseína e anormalidades nas estruturas das proteínas, o que causa uma reação de precipitação. No entanto, no nosso estudo os 8 segundos de homogeneização, apesar de superiores ao tempo descrito no estudo anterior, 7 segundos, podem não ser suficientes para ultrapassar este problema. Adicionalmente, verificou-se que, em amostras congeladas a > 6 meses ≤ 8 meses (T5), houve uma diminuição do teor de gordura (10,3%) e um aumento do valor de hidratos de carbono (5,0%), que não se refletiu na diminuição do valor energético total.

Por outro lado, García-Lara et al ⁽¹¹⁾ e outros autores, sugerem uma diminuição da gordura, lactose e valor energético total durante 6 meses de congelação de 2,8%, 1,7% e 2,2%, respetivamente. No presente estudo, não se verificou o mesmo. Amostras correspondentes ao intervalo de tempo T4 (> 3 meses ≤ 6 meses), revelaram apenas um aumento significativo do valor de hidratos de carbono de 0,45g/ml (5,5%). No entanto, podemos observar que, em T3 (> 2 meses ≤ 3 meses) e T5 (> 6 meses ≤ 8 meses), ocorreu uma diminuição do teor de gordura, de 6,0% (0,2g/ml) e 10,3% (0,9g/ml), respetivamente. Tal como os autores do estudo supracitado ⁽¹¹⁾ justificam, este resultado pode ter sido causado pelos ciclos de congelação e descongelação, que alteraram a membrana do glóbulo de gordura, permitindo a ação das lípases sobre os triglicerídeos, aumentando assim a concentração de ácidos gordos livres. Mesmo com a diminuição da atividade das enzimas após a pasteurização, os processos a que o LHDC é submetido antes, elevam o teor de ácidos gordos livres, que não conseguem ser lidos pelo aparelho de análise, devido à sua estrutura modificada, o que explica a diminuição do teor de gordura observada ¹³. Relativamente à diminuição do valor energético total, os autores explicam que este resultado se deve à diminuição do teor de gordura, uma vez que, em geral, este macronutriente é responsável pela maior parte do valor energético do LHD. No entanto, o mesmo não se verifica em T4 (> 3 meses ≤ 6 meses). Em contrapartida, em T6 (> 8 meses ≤ 12 meses), verifica-se um aumento do valor energético total (7,5%), que se deverá, possivelmente, ao aumento significativo do teor em hidratos de carbono (7,5%), uma vez que não se observa um aumento estatisticamente significativo da gordura total.

Durante os vários intervalos de tempo de congelação, T1, T3, T4, T5, T6, foi possível observar um aumento significativo do teor de hidratos de carbono. Além

disso, verificou-se que, em tempos de armazenamento mais prolongado, T4 (> 3 meses ≤ 6 meses), T5 (> 6 meses ≤ 8 meses), T6 (> 8 meses ≤ 12 meses), os aumentos foram mais significativos, 0,45g/ml, 0,4g/ml, 0,6g/ml, respetivamente. No entanto, a causa deste resultado não é clara. Apesar da evidência científica apresentar resultados controversos quanto à variação dos macronutrientes e valor energético total ao longo do tempo, nenhum estudo verificou o aumento do teor de hidratos de carbono no LHDP. Possivelmente, este resultado não seria o mesmo se fossem avaliadas mais amostras correspondentes a cada intervalo de tempo de congelação, visto que o número de amostras analisadas, representantes de cada intervalo de tempo, foi reduzido. Desta forma, são necessários mais estudos para perceber a real causa deste resultado distinto, e a sua repetibilidade.

Pontos Fortes e Limitações

O presente estudo é inovador, uma vez que segundo o nosso conhecimento da literatura atual, esta é a primeira investigação com uma amostra relativamente maior, representada por um número mais elevado de dadoras, que analisa LHD congelado há mais de 6 meses, e que, para além disso, avalia a hipótese de aumentar o tempo de congelação do LHDP para além dos 3 meses pós-pasteurização, verificando a sua integridade nutricional. Realça-se também, como sendo um ponto forte, a incorporação dos procedimentos de rotina do BLHN, o que permite representar a prática real do banco. Contudo, apresenta algumas limitações que devem ser tidas em conta na interpretação dos resultados. Em primeiro lugar, não foram avaliados os lotes das mesmas dadoras em todos os intervalos, o que não permitiu observar as diferenças intraindividuais do valor nutricional de LHD de cada dadora ao longo do tempo. Deste modo, seria

interessante criar uma subamostra, que permitisse fazer o seguimento do mesmo lote da mesma dadora, ao longo de vários tempos de congelação, de forma a avaliar a evolução da composição nutricional desde o primeiro momento em que é congelado após a pasteurização até aos 12 meses de congelação. De seguida, não foi possível comparar os grupos, T1, T2, T3, T4, T5, T6, entre si, uma vez que os lotes de LHD analisados diferem entre os vários intervalos de tempo de congelação, e por isso o T0 também será diferente em cada grupo.

Em segundo lugar, a análise nutricional do LHDP apenas foi realizada aos macronutrientes, devido ao instrumento de análise utilizado (MIRIs HMATM), que não permite identificar alterações ao nível, por exemplo, das diferentes formas de gordura, com distintas funções biológicas, como os triglicerídeos, ácidos gordos de cadeia longa, fosfolípidos, colesterol, e das vitaminas lipossolúveis. Além disso, seria altamente desejável determinar possíveis diferenças nos micronutrientes, quando sujeitos a tempos de congelação prolongados. Por outro lado, apenas foi possível avaliar LHD pós pasteurização, não permitindo perceber os efeitos da pasteurização no valor nutricional do LHD congelado ao longo do tempo, uma vez que muitos dos efeitos observados podem ter sido provocados pela pasteurização e não pela congelação, sendo interessante futuramente comparar o LHD pré e pós pasteurização congelado. Adicionalmente, não foram analisadas todas as amostras pertencentes à “Lactoteca” do BLHN, o que não permitiu obter resultados mais robustos e, por isso, no futuro seria desejável analisar as 1016 amostras de LHDC e LHDP. Para além disso, inclui-se também como ponto menos forte deste trabalho, a possível homogeneização subótima das amostras de LHDP, e por isso seria interessante o aumento do tempo de homogeneização em amostras congeladas à mais tempo para melhor uniformização do conteúdo, já que em

tempos de congelação mais longos existe a destabilização da matriz dos macronutrientes e uma possível adesão de certos compostos às paredes do *eppendorf*.

Ainda assim, até ao momento são escassos os estudos que avaliem a possibilidade de aumento do tempo de congelação, tendo em conta a qualidade nutricional do LHD. Desta forma, apesar das limitações, os resultados demonstram ser importantes e inovadores, dado o papel crucial da nutrição na evolução clínica dos bebés prematuros, contribuindo para a robustez e inovação da evidência científica sobre este tema.

Conclusões

Em conclusão, os resultados obtidos neste trabalho mostram que, o LHDP sofre alterações a nível da composição nutricional, nomeadamente macronutrientes e valor energético total, ao longo do tempo de congelação, com enfoque no aumento do teor de hidratos de carbono com o aumentar do tempo de congelação. Ainda assim, são necessários mais estudos com amostras maiores, que avaliem tempos de congelação mais específicos e longos, de forma a perceber exatamente em que altura do armazenamento é que se verificam as diferenças mais significativas, e que suportem as conclusões encontradas. Desta forma, espera-se que os resultados encontrados ajudem na robustez da evidência científica sobre este tema, e que criem alavancas de desenvolvimento para a criação de novos métodos de processamento do LHD, e alteração dos tempos de congelação permitidos, de forma a diminuir os custos e evitar o desperdício de LHD.

Referências

1. Wang K, Zhao Y, Song S, Lin Y, Luo Y, Zhang Y, et al. Changes in properties of human milk under different conditions of frozen storage. *Food Res Int.* 2024; 176:113768.
2. Leghi GE, Middleton PF, Netting MJ, Wlodek ME, Geddes DT, Muhlhausler BS. A Systematic Review of Collection and Analysis of Human Milk for Macronutrient Composition. *J Nutr.* 2020; 150(6):1652-70.
3. Gao C, Miller J, Middleton PF, Huang YC, McPhee AJ, Gibson RA. Changes to breast milk fatty acid composition during storage, handling and processing: A systematic review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2019; 146:1-10.
4. Blackshaw K, Wu J, Proschogo N, Davies J, Oldfield D, Schindeler A, et al. The effect of thermal pasteurization, freeze-drying, and gamma irradiation on donor human milk. *Food Chem.* 2022; 373(Pt B):131402.
5. World Health Organization. Protecting, promoting and supporting breastfeeding in facilities providing maternity and newborn services. 2017:120.
6. Moro GE, Billeaud C, Rachel B, Calvo J, Cavallarin L, Christen L, et al. Processing of Donor Human Milk: Update and Recommendations From the European Milk Bank Association (EMBA). *Front Pediatr.* 2019; 7:49.
7. Sánchez Luna M, Martin SC, Gómez-de-Orgaz CS. Human milk bank and personalized nutrition in the NICU: a narrative review. *Eur J Pediatr.* 2021; 180(5):1327-33.
8. World Health Organization. (2004). ICD-10 : international statistical classification of diseases and related health problems : tenth revision, 2nd ed. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/42980>
9. Lozano B, Castellote AI, Montes R, López-Sabater MC. Vitamins, fatty acids, and antioxidant capacity stability during storage of freeze-dried human milk. *Int J Food Sci Nutr.* 2014; 65(6):703-7.
10. Villamor-Martínez E, Pierro M, Cavallaro G, Mosca F, Kramer BW, Villamor E. Donor Human Milk Protects against Bronchopulmonary Dysplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2018; 10(2).

11. Garcia-Lara NR, Vieco DE, De la Cruz-Bertolo J, et al. Effect of Holder pasteurization and frozen storage on macronutrients and energy content of breast milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 57:377-82.
12. Nessel I, Khashu M, Dyllal SC. The effects of storage conditions on long-chain polyunsaturated fatty acids, lipid mediators, and antioxidants in donor human milk - A review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2019; 149:8-17.
13. Blackshaw K, Wu J, Valtchev P, Lau E, Banati RB, Dehghani F, et al. The Effects of Thermal Pasteurisation, Freeze-Drying, and Gamma-Irradiation on the Antibacterial Properties of Donor Human Milk. *Foods*. 2021; 10(9).
14. Waard M, Mank E, van Dijk K, Schoonderwoerd A, van Goudoever JB. Holder-Pasteurized Human Donor Milk: How Long Can It Be Preserved? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018; 66(3):479-83.
15. Paulaviciene IJ, Liubsys A, Eidukaite A, Molyte A, Tamuliene L, Usonis V. The Effect of Prolonged Freezing and Holder Pasteurization on the Macronutrient and Bioactive Protein Compositions of Human Milk. *Breastfeed Med*. 2020; 15(9):583-88.

