



ARTIGO ORIGINAL

## Freezing and thawing effects on fat, protein, and lactose levels of human natural milk administered by gavage and continuous infusion<sup>☆</sup>



Andrea D. Abranches, Fernanda V.M. Soares, Saint Clair G. Junior  
e Maria Elisabeth L. Moreira\*

Instituto Nacional de Saúde da Mulher, Criança e Adolescente Fernandes Figueira (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Recebido em 12 de julho de 2013; aceito em 11 de novembro de 2013

### KEYWORDS

Human milk;  
Nutrition;  
Newborn

### Abstract

**Objectives:** to analyze the changes in human milk macronutrients: fat, protein, and lactose in natural human milk (raw), frozen and thawed, after administration simulation by gavage and continuous infusion.

**Method:** an experimental study was performed with 34 human milk samples. The infrared spectrophotometry using the infrared analysis equipment MilkoScan Minor® (Foss, Denmark) equipment was used to analyze the macronutrients in human milk during the study phases. The analyses were performed in natural (raw) samples and after freezing and fast thawing following two steps: gavage and continuous infusion. The non-parametric Wilcoxon test for paired samples was used for the statistical analysis.

**Results:** the fat content was significantly reduced after administration by continuous infusion ( $p < 0.001$ ) during administration of both raw and thawed samples. No changes in protein and lactose content were observed between the two forms of infusion. However, the thawing process significantly increased the levels of lactose and milk protein.

**Conclusion:** the route of administration by continuous infusion showed the greatest influence on fat loss among all the processes required for human milk administration.

© 2014 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

DOI se refere ao artigo:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2013.11.001>

<sup>☆</sup> Como citar este artigo: Abranches AD, Soares FV, Junior SC, Moreira ME. Freezing and thawing effects on fat, protein, and lactose levels of human natural milk administered by gavage and continuous infusion. J Pediatr (Rio J). 2014;90:384–8.

\* Autor para correspondência.

E-mail: bebeth@iff.fiocruz.br (M.E.L. Moreira).

**PALAVRAS-CHAVE**

Leite humano;  
Nutrição;  
Recém-nascido

**Efeito do congelamento e descongelamento nos níveis de gordura, proteína e lactose do leite humano natural administrados por gavagem e infusão contínua****Resumo**

**Objetivo:** analisar as alterações dos macronutrientes gordura, proteína e lactose no leite humano natural, congelado e descongelado, após a simulação da administração da dieta por gavagem e infusão contínua.

**Método:** foi conduzido um estudo experimental com 34 amostras de leite humano. Foi utilizada a técnica da espectrofotometria infravermelha (Milko Scan Minor®) para analisar os macronutrientes do leite humano nas etapas do estudo. As amostras foram analisadas na forma natural (crua) e após congelamento e descongelamento rápido nas duas formas de infusão: gavagem e infusão contínua. Foi usado o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas na análise estatística.

**Resultado:** a gordura apresentou redução significativa após administração por infusão contínua ( $p < 0,001$ ), tanto durante administração na forma natural quanto na forma descongelada. Não houve alteração da proteína e lactose segundo forma de infusão no leite descongelado e no leite in natura. O processo de descongelamento aumentou significativamente os níveis de lactose e de proteína do leite.

**Conclusão:** a via de administração por infusão contínua foi o procedimento que mais influenciou na perda de gordura, dentre todos os processos necessários para administração do leite humano. © 2014 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

**Introdução**

O leite humano é o alimento ideal para o recém-nascido a termo e pré-termo, facilitando o desenvolvimento.<sup>2</sup> Em idades gestacionais menores que 34 semanas, os recém-nascidos ainda não são incapazes de sugar, deglutir e respirar adequada e coordenadamente. Nesses casos, a administração da dieta oral deve ocorrer com a utilização de sondas, o que implica em coleta, manipulação, estocagem e administração do leite humano.<sup>3</sup> Esses procedimentos podem comprometer a qualidade nutricional de leite, privando os recém-nascidos pré-termo de uma porção significativa de calorias provenientes da gordura.<sup>4-6</sup>

Vieira et al.<sup>7</sup> observaram uma redução significativa da gordura entre o leite natural (cru) doado e o leite final a ser ofertado. Entre os processos relacionados à oferta do leite humano estudados, a maior redução ocorreu após a simulação da oferta do leite por infusão contínua.

O processamento de congelamento e descongelamento pode alterar as propriedades físico-químicas do leite, portanto, as perdas durante a infusão contínua também podem ser afetadas por estas mudanças. O congelamento e o descongelamento favorecem a formação de micelas, que podem se aderir aos plásticos, facilitando a perda de gordura.<sup>4,7</sup> Portanto, tornou-se necessário esclarecer se esta perda maior na infusão contínua poderia estar sendo ocasionada pelo processo de descongelamento ou se a via de administração (gavagem ou infusão contínua) seria a maior responsável.

O objetivo deste estudo foi analisar as alterações dos macronutrientes gordura, proteína e lactose no leite humano natural, congelado e descongelado, após a simulação da administração da dieta por gavagem e infusão contínua.

**Método**

Foi realizado um estudo experimental com amostras de leite humano proveniente de doadoras voluntárias do Banco de Leite Humano, do Instituto Nacional em Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira. Todas as doadoras eram mães de recém-nascidos a termo e o leite foi colhido no período da manhã.

O leite foi ordenhado através de expressão manual ou bomba elétrica e armazenado em frascos de vidro. Do total de volume coletado, foram utilizados 50 mL, os quais foram divididos em três alíquotas de 10 mL e uma de 20 mL. Esta última foi congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, e descongelada em microondas por 45 segundos.<sup>6</sup>

Imediatamente após a ordenha do leite foram realizadas as análises do leite humano natural. Das três alíquotas de 10 mL, uma foi identificada como referência (não sendo submetida a qualquer processamento); outra foi identificada para simulação da administração por gavagem; e a última para administração por infusão contínua.

Para administração por gavagem foi utilizada seringa de 10 mL e sonda descartável siliconizada n° 4, sendo o conteúdo impulsionado pela força da gravidade.

Na administração por infusão contínua foi utilizada seringa de 10 mL, sonda descartável siliconizada n° 4, perfusor de 120 cm e bomba infusora Samtronic ST6000® (São Paulo, Brasil). O tempo estabelecido para infusão do leite humano foi de 1 hora. Todos os materiais e técnicas utilizados seguem a rotina da Unidade Neonatal do Instituto Fernandes Figueira/Fiocruz/Brasil.

A quantidade de gordura, proteína e lactose do leite humano foi dosada pela técnica da espectrofotometria infravermelha, através do aparelho *Infrared Analysis* (Milko Scan Minor 104®, Foss, Denmark), já validada para leite humano.<sup>7</sup>

O cálculo do tamanho amostral foi feito considerando a magnitude de diferença encontrada entre as dosagens de gordura nas duas formas de administração (gavagem e infusão contínua) no estudo de Vieira et al.<sup>7</sup>, com um poder de 90% e significância de 95%. Neste estudo, a magnitude de diferença foi de 0,94 g/100 mL. Considerando estes parâmetros, o tamanho amostral inicial foi de 16 amostras, o qual foi dobrado devido à variabilidade do conteúdo de gordura nas amostras de leite.<sup>8,9</sup>

As dosagens dos macronutrientes e calorias totais nas amostras do leite humano foram comparadas a cada etapa usando Teste de Wilcoxon para amostras pareadas (SPSS 20.0).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional da Saúde da Mulher, Criança e Adolescentes Fernandes Figueira, e foi solicitado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## Resultados

Foram analisadas 34 amostras de leite humano. Observou-se uma variação dos macronutrientes entre as amostras doadas de 19% para gordura, 1,9% para proteína e 1,6% para lactose. Não foram analisadas amostras de *pool* de leite humano.

A média do conteúdo dos macronutrientes em g/100 mL no leite natural foi de  $3,05 \pm 1,18$  para gordura,  $1,22 \pm 0,50$  para proteína e  $6,09 \pm 0,55$  para lactose. A média para as calorias totais foi de  $56,66 \pm 11,76$  Kcal/100 mL.

A administração do leite por infusão contínua alterou significativamente os níveis de gordura quando comparado à gavagem, tanto durante a infusão do leite natural quanto no descongelado (tabela 1).

Foi observado também um aumento significativo de proteína quando o leite descongelado foi usado, comparado ao natural. Entretanto, não foi observada diferença significativa nos valores da proteína no leite descongelado ofertado por gavagem e infusão contínua. (tabela 1).

A utilização da gavagem não implicou em perdas dos macronutrientes tanto no leite natural quanto no descongelado (tabela 1).

A média da diferença entre o conteúdo de gordura no leite natural ofertado por gavagem e infusão contínua foi de  $0,24 \pm 0,31$  (mediana = 0,18) e do leite descongelado ofertado por gavagem e infusão contínua foi de  $0,26 \pm 0,17$  (mediana 0,17).

A perda de gordura pelo descongelamento foi semelhante nas duas vias de administração ( $p=0,853$ ). A diferença do conteúdo de gordura entre a forma natural e a descongelada foi de 0,3 g/100 mL para a infusão contínua e de 0,2 g/100 mL para a gavagem.

## Discussão

A análise da influência do manuseio do leite humano nos macronutrientes, desde sua obtenção até a oferta final ao recém-nascido, é de grande importância quando se considera os efeitos da nutrição adequada no crescimento e desenvolvimento dos recém-nascidos pré-termo.<sup>2</sup> Neste estudo observou-se que a escolha da via de administração por infusão contínua compromete significativamente a

concentração de gordura, seja no leite humano natural ou descongelado.

A perda de gordura é em geral atribuída à aderência desta no frasco, à lipólise ou à peroxidação de lipídio.<sup>10</sup> A redução do conteúdo de gordura em leite humano descongelado também foi verificada em outros estudos,<sup>11,12</sup> que sugerem que a lipólise continuaria ocorrendo no leite congelado.<sup>13,14</sup> A gordura em repouso separa-se facilmente e se adere ao frasco, sondas e seringas, o que reduz sua oferta ao recém-nascido. Embora o efeito do congelamento/descongelamento não tenha sido estatisticamente significativo nas duas vias de infusão, a associação entre o descongelamento e a infusão contínua significou uma perda de 0,5 g de gordura por 100 mL de leite, causando uma redução de cerca de 18% no conteúdo de gordura do leite para 100 mL, o que pode trazer importantes repercussões clínicas e nutricionais para os pré-termo.<sup>1</sup> Uma das formas de diminuir estas perdas é a homogeneização do leite antes da oferta ao recém-nascido.<sup>15</sup>

Uma questão observada neste estudo foram as concentrações menores de gordura e de calorias totais no leite humano do que o relatado em outros estudos internacionais.<sup>8,9,16</sup> Estudos no Brasil também já evidenciaram valores menores no conteúdo de gordura, embora técnicas diferentes tenham sido utilizadas.<sup>17,18</sup>

Em relação à proteína e à lactose, verificou-se que, inesperadamente, seus valores aumentavam após o descongelamento. Após o congelamento/descongelamento houve aumento significativo nas suas concentrações. Este fato pode estar relacionado com a perda de água no congelamento e descongelamento (volatilização), sublimação e aumento da *infrared* absorvância de proteína no comprimento de onda  $5.7 \mu\text{m}$ , também observado em outros estudos e atribuído a estas propriedades.<sup>10,19</sup> Além disso, o descongelamento do leite humano pode causar a agregação das micelas de proteína, resultando em uma variação do conteúdo proteico.<sup>20</sup>

Em relação ao conteúdo energético, observou-se uma variação importante (50,1 Kcal/100 mL) entre as amostras do leite natural estudadas, demonstrando a importância do controle relacionado ao conteúdo nutricional do material doado aos dos bancos de leite humano. O conteúdo energético do leite, em geral, está relacionado ao conteúdo de gordura, uma vez que a densidade calórica deste macronutriente é responsável pela maior parte das calorias do leite humano.<sup>7,8</sup> Neste estudo, os valores energéticos foram menores nas amostras onde o conteúdo de gordura era menor.

Os processos usados desde a ordenha até a oferta do leite humano implicam, portanto, em alterações importantes nos seus macronutrientes, fato observado por diversos autores.<sup>4,7,16,19-24</sup> As alterações encontradas segundo a via de infusão do leite também foram observadas nos estudos de Vieira et al.<sup>7</sup> e de Stoks et al.<sup>25</sup> O processo de infusão do leite por gavagem não ocasionou perdas significativas na gordura, provavelmente porque havia menos perda relacionada à aderência da gordura ao plástico, uma vez que a sonda é muito menor que os perfusores usados na infusão contínua. O tempo gasto para a infusão nas duas modalidades também pode ter influenciado.<sup>25</sup>

As limitações deste estudo consistem no fato de terem sido estudados apenas os macronutrientes e de ter sido

**Tabela 1** Valores das medianas, mínimo e máximo dos macronutrientes e calorias totais por 100 mL do leite humano, segundo os processos estudados. Rio de Janeiro, 2013

Vias de administração	Gordura <sup>a</sup>	p	Proteína <sup>a</sup>	p	Lactose <sup>a</sup>	p	Calorias Totais <sup>b</sup>	p
Natural	2,9 (1,1-5,8)	-	1,1 (0,5-2,6)	-	6,4 (4,9-6,7)	-	54,9 (37,4-87,5)	-
Natural gavagem	3,0 (1,1-5,8)	0,054	1,2 (0,6-2,6)	0,060	6,4 (4,9-6,8)	0,110	55,4 (37,7-88,0)	0,052
Natural	2,9 (1,1-5,8)	-	1,1 (0,5-2,6)	-	6,4 (4,9-6,7)	-	54,9 (37,4-87,5)	-
Natural infusão contínua	2,7 (1,0-5,9)	0,000 <sup>c</sup>	1,2 (0,4-2,7)	0,308	6,4 (4,9-6,8)	0,190	53,1 (36,4-84,0)	0,001 <sup>c</sup>
Natural	2,9 (1,1-5,8)	-	1,1 (0,5-2,6)	-	6,4 (4,9-6,7)	-	54,9 (37,4-87,5)	-
Descongelado gavagem	2,8 (1,3-5,8)	0,335	1,3 (0,2-2,5)	0,046 <sup>c</sup>	6,5 (5,1-7,2)	0,000 <sup>c</sup>	54,3 (37,7-83,6)	0,966
Natural	2,9 (1,1-5,8)	-	1,1 (0,5-2,6)	-	6,4 (4,9-6,7)	-	54,9 (37,4-87,5)	-
Descongelado infusão contínua	2,4 (1,0-5,1)	0,000 <sup>c</sup>	1,3 (0,2-2,5)	0,007 <sup>c</sup>	6,5 (5,0-7,0)	0,096	53,2 (35,3-78,2)	0,185
Natural gavagem	3,0 (1,1-5,8)	-	1,2 (0,6-2,6)	-	6,4 (4,9-6,8)	-	55,4 (37,7-88,0)	-
Descongelado gavagem	2,8 (1,3-5,8)	0,108	1,3 (0,2-2,5)	0,014 <sup>c</sup>	6,5 (5,1-7,2)	0,000 <sup>c</sup>	54,3 (37,7-83,6)	0,726
Natural infusão contínua	2,7 (1,0-5,9)	-	1,2 (0,4-2,7)	-	6,4 (4,9-6,8)	-	53,1 (36,4-84,0)	-
Descongelado infusão contínua	2,4 (1,0-5,1)	0,091	1,3 (0,2-2,5)	0,017 <sup>c</sup>	6,5 (5,0-7,0)	0,001 <sup>c</sup>	53,2 (35,3-78,2)	0,871
Natural gavagem	3,0 (1,1-5,8)	-	1,2 (0,6-2,6)	-	6,4 (4,9-6,8)	-	55,4 (37,7-88,0)	-
Natural infusão contínua	2,7 (1,0-5,9)	0,000 <sup>c</sup>	1,2 (0,4-2,7)	0,812	6,4 (4,9-6,8)	0,123	53,1 (36,4-84,0)	0,000 <sup>c</sup>
Descongelado gavagem	2,8 (1,3-5,8)	-	1,3 (0,2-2,5)	-	6,5 (5,1-7,2)	-	54,3 (37,7-83,6)	-
Descongelado infusão contínua	2,4 (1,0-5,1)	0,000 <sup>c</sup>	1,3 (0,2-2,5)	0,147	6,5 (5,0-7,0)	0,060	53,2 (35,3-78,2)	0,040 <sup>c</sup>

Teste de Wilcoxon.

<sup>a</sup> g/100 mL.

<sup>b</sup> Kcal/100 mL.

<sup>c</sup> Estatisticamente significativo (valor de  $p < 0,05$ ).

utilizada apenas a forma de descongelamento rápido através do micro-ondas. O aquecimento excessivo pode destruir os elementos imunológicos do leite humano, mas não necessariamente os componentes nutricionais que foram objeto deste estudo.<sup>26</sup> A ANVISA e a Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano, em seus manuais instrutivos, citam esta prática.<sup>6</sup> Outro resultado encontrado neste estudo foi uma magnitude menor entre as diferenças nos valores de gordura segundo via de infusão, comparado ao estudo de Vieira et al.,<sup>7</sup> o que implicaria em tamanhos amostrais maiores em estudos posteriores.

O leite humano continua a ser o melhor alimento a ser oferecido aos recém-nascidos, inclusive aos pré-termo, mas as perdas nutricionais de gordura relacionadas à infusão contínua devem ser consideradas quando se opta por esta via de administração.

## Financiamento

FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro).

## Conflitos de interesse

A autora Maria Elisabeth L. Moreira foi palestrante da Mead-Johnson, Nestlé e ABBOTT no último ano.

## Referências

- Higgins RD, Devaskar S, Hay Jr WW, Ehrenkranz RA, Kennedy K, Meier P, et al. Executive summary of the workshop "Nutritional challenges in the High Risk Infant". *J Pediatr*. 2012;160:511-6.
- Fonseca AL, Albernaz EP, Kaufmann CC, Neves IH, Figueiredo VL. Impact of breastfeeding on the intelligence quotient of eight-year-old children. *J Pediatr (Rio J)*. 2013;89:346-53.
- Leone CR, Neiva FCB. Avaliação e estimulação do recém-nascido pré-termo para alimentação por via oral. In: Pereira G, Leone CR, Filho NA, Filho OT, editors. *Nutrição do recém-nascido pré-termo*. Rio de Janeiro: Editora Medbook; 2008. p. 61-8.
- Rogers SP, Hicks PD, Hamzo M, Veit LE, Abrams SA. Continuous feedings of fortified human milk lead to nutrient losses of fat, calcium and phosphorous. *Nutrients*. 2010;2:230-40.
- Bauer J, Gerstl J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clin Nutr*. 2011;30:215-20.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. In: Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa; 2008.
- Vieira AA, Soares FV, Porto HP, Abranches AD, Moreira ME. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Hum Dev*. 2011;87:577-80.
- Cooper AR, Barnett D, Gentles E, Cairns L, Simpson JH. Macronutrient content of donor human breast milk. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2013;98:539-41.
- de Halleux V, Rigo J. Variability in human milk composition: benefit of individualized fortification in very-low-birth-weight infants. *Am J Clin Nutr*. 2013;98:529S-35S.
- Chang Y, Chen C, Lin M. The macronutrients in human milk change after storage in various Containers. *Pediatr-neonatology*. 2012;53:205-9.
- Cavalcante JL, Telles FJ, Peixoto MM, Rodrigues RC. Uso da acidez titulável no controle de qualidade do leite humano ordenhado. *Cienc Tecnol Aliment*. 2005;25:103-8.
- Wardell JM, Hill CM, D'Souza SW. Effect of pasteurization and of freezing and thawing human milk on its triglyceride content. *Acta Paediatr Scand*. 1981;70:467-71.
- Björkstén B, Burgan LG, Dechâteau P, Fredrikzon B, Gothefors L, Hernell O. Collecting and banking human milk: to heat or not to heat? *British Med J*. 1980;281:765-9.
- Hamosh M, Henderson TR, Ellis LA, Mao JI. Digestive enzymes in human milk: stability at suboptimal storage temperatures. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997;24:38-43.
- Vieira AA, Moreira ME, Rocha AD, Pimenta HP, Lucena SL. Análise do conteúdo energético do leite humano administrado a recém-nascidos de muito baixo peso ao nascimento. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:490-4.
- Silva RC, Escobedo JP, Gioielli LA. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. *Quim Nova*. 2007;30:1535-8.
- Góes HC, Torres AG, Donangelo CM, Trugo NM. Nutrient composition of banked human milk in Brazil and influence of processing on zinc distribution in milk fractions. *Nutrition*. 2002;18:590-4.
- Bortolozzo EA, Tibone EB, Candido LM. Leite humano processado em bancos de leite para o recém-nascido de baixo peso: análise nutricional e proposta de um novo complemento. *Rev Panam Salude Publica*. 2004;16:199-205.
- Kaylegian KE, Lynch JK, Fleming JR, Barbano DM. Lipolysis and proteolysis of modified and producer milks used for calibration of mid-infrared milk analysers. *J Dairy Sci*. 2007;90:602-15.
- Menjo A, Mizuno K, Murase M. Bedside analysis of human milk for adjustable nutrition strategy. *Acta Paediatr*. 2009;98:380-4.
- Garza C, Johnson CA, Harrist R, Nichols BL. Effects of methods of collection and storage on nutrients in human milk. *Early Hum Dev*. 1982;6:295-303.
- García-Lara NR, Vieco DE, De la Cruz-Bértolo J, Lora-Pablos D, Velasco NU, Pallás-Alonso CR. Effect of holder pasteurization and frozen storage on macronutrients and energy content of breast milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;57:377-82.
- Casadio YS, Williams TM, Lai CT, Olsson SE, Hepworth AR, Hartmann PE. Evaluation of a mid-infrared analyzer for the determination of the macronutrient composition of human milk. *J Hum Lact*. 2010;26:376-83.
- Wojcik KY, Rechtman DJ, Lee ML, Montoya A, Medo ET. Macronutrient analysis of a nationwide sample of donor breast milk. *J Am Diet Assoc*. 2009;109:137-40.
- Stocks RJ, Davies DP, Allen F, Sewell D. Loss of breast milk nutrients during tube feeding. *Arch Dis Child*. 1985;60:164-6.
- Ke E. Fat loss in stored, refrigerated/thawed expressed breast milk. *Indian Pediatrics*. 2012;49:867-8.