

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS PERFIS ANTIOXIDANTE,
PRÓ-OXIDANTE E TEOR DE PROTEÍNAS TOTAIS NO LEITE
MATERNO FRESCO E APÓS O ARMAZENAMENTO**

VANIA PAULA DAMASCENO RIBEIRO

VILA VELHA
FEVEREIRO/2022

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS PERFIS ANTIOXIDANTE,
PRÓ-OXIDANTE E TEOR DE PROTEÍNAS TOTAIS NO LEITE
MATERNO FRESCO E APÓS O ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências farmacêuticas.

VANIA PAULA DAMASCENO RIBEIRO

VILA VELHA
FEVEREIRO/2022

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

R484a Ribeiro, Vania Paula Damasceno.

Avaliação da estabilidade dos perfis antioxidante, pró-oxidante e teor de proteínas totais no leite materno fresco e após o armazenamento / Vania Paula Damasceno Ribeiro. – 2022.
48 f. : il.

Orientador: Marcio Fronza.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Vila Velha, 2022.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Leite - Proteína.
3. Antioxidantes. I. Fronza, Márcio. II. Universidade Vila Velha
III. Título.

CDD 615

VANIA PAULA DAMASCENO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS PERFIS ANTIOXIDANTE,
PRÓ-OXIDANTE E TEOR DE PROTEÍNAS TOTAIS NO LEITE
MATERNO FRESCO E APÓS O ARMAZENAMENTO**

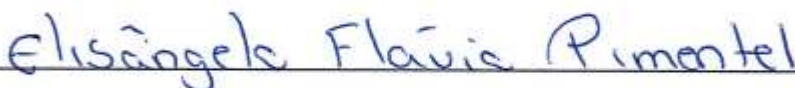
Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção do grau de
Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2022,

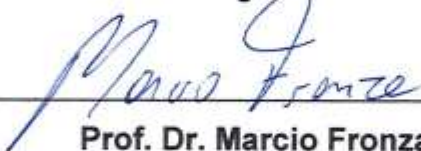
Banca Examinadora:



Profa. Dra Mônica Barros de Pontes – UFES/UVV

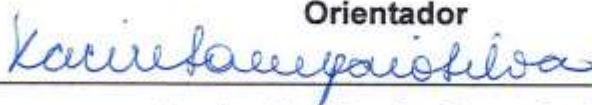


Profa. Dra Elisângela Flavia Pimentel - UVV



Prof. Dr. Marcio Fronza – UVV

Orientador



Profa. Dra. Racire Sampaio Silva – UVV

(Co-orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e iluminar, permitindo que eu caminhasse em direção aos meus objetivos, superando todas as dificuldades e me protegendo em todos os momentos.

Agradeço ao meu Pai Luiz por sempre me incentivar aos estudos e por ter me educado no caminho do bem.

Agradeço a meu esposo Renato, por me apoiar e me incentivar para a busca dos meus objetivos, por ser meu amigo e maior incentivador para realizar meus sonhos.

Ao meu orientador e Professor Doutor Marcio Fronza, pelos ensinamentos, pela paciência e pela disposição em sempre me atender e de igual forma agradeço também a minha co orientadora Racire Sampaio.

Aos meus colegas de pesquisa e as alunas da iniciação científica Ana e Renata, por terem contribuído com minha pesquisa.

A todos os professores e funcionários da Universidade de Vila Velha (UVV) e do Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PPGCF) e da Especialização em Bioprática; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e o apoio financeiro estadual do Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e todos contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

SUMÁRIO

1.	LISTA DE FIGURAS.....	7
2.	LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
3.	RESUMO.....	9
4.	ABSTRACT	10
5.	INTRODUÇÃO.....	11
6.	REFERÊNCIAS.....	17
7.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	22
8.	ANEXOS.....	39
	ANEXO A -Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE)....	39
	ANEXO B-Questionário de Anamnese e sociodemográfico.....	41
	ANEXO C- Comprovante de aprovação no CEP.....	46
	ANEXO D- Comprovante de submissão do trabalho para publicação.	50

LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1:** Atividade antioxidante do leite materno determinado pelo método de eliminação do radical ABTS.....29
- **Figura 2:** Atividade antioxidante do leite materno determinado pelo método de redução do ferro (FRAP)
.....30
- **Figura 3:** Atividade pró oxidante do leite materno determinado pelo método de substâncias reativas ao tiobarbitúrico ácido (TBARS)
..... 31
- **Figura 4:** Quantidade de proteínas totais do leite materno determinado pelo método colorimétrico de Bradford.....32

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS- 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

DHA- Ácido docosaenoico

ALA- Ácido α -linolênico

AGs- Ácidos graxos

AOPP- Produtos proteicos de oxidação avançada

EO- Estresse oxidativo

ERO- Espécies reativas de oxigênio

ERN- Espécies reativas de nitrogênio

FRAP- Redução do Ferro

GPx- Glutathionaperoxidase

LCPUFAs -Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa

MDA- Malondialdeído

OMS- Organização Mundial de Saúde

RN-recém-nascido

TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

RESUMO

RIBEIRO, Vania, P.D, Universidade Vila Velha - ES, fevereiro de 2022. **Avaliação da estabilidade dos perfis antioxidante, pró-oxidante e teor de proteínas totais no leite materno fresco e após o armazenamento.** Orientador: Prof. Dr. Marcio Fronza. Coorientadora: Profa. Dra. Racire Sampaio Silva.

O leite materno é uma importante fonte de nutrição para o lactente, sendo considerado o alimento essencial para a saúde e crescimento do bebê e, proteção contra inúmeras doenças, é considerado uma importante fonte de agentes antioxidantes sendo considerado uma verdadeira arma de defesa e proteção contra os diversos danos que podem ser causados pelos radicais livres, incluindo a peroxidação lipídica. Considerando que em algumas ocasiões as mães estão impossibilitadas de amamentar, sendo necessário armazenar o leite o leite materno, o objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade dos perfis antioxidante, pró-oxidante e o teor de proteínas no leite materno fresco e após diferentes tempos (2, 7, 14 e 21 dias de armazenamento nas temperaturas de 4° C e – 20°C , temperaturas que geralmente são utilizadas pelas mães em geladeiras domésticas, para que o leite armazenado seja oferecido com qualidade para o lactente. Foram selecionadas para a pesquisa uma amostra de 20 mães voluntárias, maiores de 18 anos que concordaram em participar da pesquisa. A atividade antioxidante do leite materno foi determinada pelos métodos do sequestro do radical livre (ABTS) e pelo método da redução do Ferro (FRAP). O estresse oxidativo foi avaliado pelo nível de peroxidação lipídica, por meio da dosagem de malondialdeído (MDA) e, o teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford. Os resultados encontrados indicam que o perfil antioxidante do leite materno, tanto pelo teste do ABTS como do FRAP se mantiveram relativamente estáveis até o 14º dia, apresentando uma diminuição significativa no 21º dia de armazenamento nas temperaturas de 4° C e – 20°C. O perfil oxidativo não apresentou alterações significativas quando o leite foi armazenado a temperatura de -20°C, porém quando armazenado a 4°C resultou em um aumento gradual com níveis significantes de oxidação após 21 dias. Não houve alteração no teor de proteínas totais durante o período do estudo em ambas as temperaturas avaliadas. Nossos resultados demonstraram que -20°C para o armazenamento pelo período de 14 dias são consideradas as melhores condições de armazenamento para preservar as propriedades antioxidantes e prevenir a peroxidação do leite materno.

Palavras-chaves: leite materno, estabilidade, antioxidante, peroxidação lipídica.

ABSTRACT

RIBEIRO, Vania, P.D, Universidade Vila Velha - ES, february of 2022. **Evaluation of the stability of antioxidant, pro-oxidant and total protein content in fresh breast milk and after storage.** Advisor: Prof. Dr. Marcio Fronza. Co-advisor: Profa. Dra. Racire Sampaio Silva.

Breast milk is an important source of nutrition for the infant and is considered the essential food for the health and growth of the baby and protection against numerous diseases. Newborns experience high oxidative stress at birth, when they migrate from an environment with low oxygen conditions to an oxygenated environment. In this way they produce a lot of free radicals that can lead to childhood diseases. Breastfeeding is considered an important source of antioxidant agents and is considered a real weapon of defense and protection against the various damages that can be caused by free radicals, including lipid peroxidation. Considering that on some occasions mothers are unable to breastfeed, and it is necessary to store breast milk, the objective of this study was to evaluate the stability of the antioxidant and pro-oxidant profiles and the protein content in fresh breast milk and after different times and periods. storage temperatures, so that the stored milk is offered with quality for the infant. A sample of 20 volunteer mothers, over 18 years of age, who agreed to participate in the research, were selected for the research. The antioxidant activity of breast milk was determined by the free radical scavenging methods (ABTS) and the iron reduction method (FRAP). Oxidative stress was evaluated by the level of lipid peroxidation, through the dosage of malondealdehyde (MDA) and the total protein content was determined by the Bradford method. The results found indicate that the antioxidant profile of breast milk, both by the ABTS and FRAP tests, remained relatively stable until the 14th day, showing a significant decrease on the 21st day of storage at both temperatures. The oxidative profile did not show significant changes when the milk was stored at -20°C, but when stored at 4°C it resulted in a gradual increase with significant levels of oxidation after 21 days. There was no change in total protein content during the study period at both temperatures evaluated. Our results showed that -20°C for storage for a period of 14 days are considered the best storage conditions to preserve the antioxidant properties and prevent peroxidation of breast milk.

Keywords: breast milk, stability, antioxidant, lipid peroxidation.

INTRODUÇÃO GERAL

O aleitamento materno é essencial para garantir crescimento e desenvolvimento saudáveis de bebês e crianças, é considerado o alimento ideal, pois é suficiente para suprir todas as suas necessidades nutricionais durante os primeiros seis meses de vida, permitindo que os bebês permaneçam em aleitamento materno exclusivo durante este período, sem a necessidade de introdução de alimentação complementar (BRASIL, 2015). Para a Organização Mundial da Saúde (OMS) a amamentação deve iniciar ainda na sala de parto na primeira hora de vida (Nunes, 2015). A amamentação reduz o risco de infecções, doenças não transmissíveis, alergias, doenças respiratórias, otites, obesidade, além de diabetes tipo 2 e, para as mães, reduz o risco de câncer de mama e ovário (Cascone et al., 2019).

Além do fator nutricional, o aleitamento materno oferece benefícios psicológicos, tanto para o bebê, quanto para a mãe, as mães que amamentam relatam um efeito positivo no bem-estar emocional, com relatos de diminuição nos níveis de mau humor, ansiedade e estresse, em relação as mães que alimentam os bebês com fórmula (BRASIL. Ministério da Saúde, 2009). Em relação aos efeitos psicológicos nas crianças, os bebês em aleitamento materno, apresentam maior vínculo afetivo com as mães, além de um melhor desenvolvimento cognitivo e motor (Krol & Grossmann, 2018). O aleitamento materno também está associado a diminuição da morbimortalidade infantil, ao se associar crianças amamentadas com menos episódios de diarreia, infecções respiratórias agudas e outras enfermidades infectocontagiosas (Nunes, 2015).

O período da lactação se inicia na gravidez, quando ocorre a neoformação de ácinos, responsáveis pelo aumento do volume da glândula mamária. Quando a gravidez chega ao fim a mama se desenvolve de forma mais evidente e se inicia a formação do colostro, que é o primeiro leite produzido pelas mães, período chamado de lactogenese (Órfão & Gouveia, 2009).

Durante a sucção, ocorre a liberação do hormônio produzido pela hipófise posterior, a ocitocina, responsável por contrair as células mioepiteliais que envolvem os alvéolos, expulsando o leite neles contido, ocorrendo a ejeção do leite (BRASIL, 2009). A estimulação pelo bebê, com a sucção das mamas, das múltiplas terminações

nervosas presentes no mamilo, produz impulsos sensitivos que são conduzidos ao hipotálamo levando à rápida produção e liberação de ocitocina (Calil et al., 2003).

A composição do leite humano muda ativamente durante a lactação e entre mães e populações; é influenciado por fatores genéticos e ambientais e pelo estilo de vida materno, incluindo hábitos alimentares (Bravi et al., 2016). Varia também de acordo com o tempo pós-parto, se é colostro, leite de transição ou leite maduro. O colostro, produzido nos primeiros dias após o nascimento, é relatado como sendo mais rico em proteínas, vitamina A, vitamina B-12 e vitamina K (Bardanzellu et al., 2017). As imunoglobulinas representam a maior parte proteica do colostro, constituindo, nessa fase da lactação, elementos de fundamental importância na proteção do recém-nascido (RN) contra microrganismos aos quais está exposto (Calil et al., 2003).

Durante as quatro semanas seguintes, a composição do leite muda gradualmente. A dieta materna influencia na composição do leite, principalmente em relação às concentrações de ácidos graxos (AGs) e vitaminas (Bravi et al., 2016). Nas primeiras quatro ou seis semanas de vida os níveis de proteína diminuem enquanto aumentam as gorduras (Ballard & Morrow, 2013).

As proteínas do leite atuam no desenvolvimento intestinal (fatores de crescimento, lactoferrina) e absorção de nutrientes (lipase estimulada pelo sal biliar, amilase, alfa1-antitripsina) e possuem atividade imune e antimicrobiana (lactoferrina, IgA secretora, osteopontina, citocinas, lisozima (Mosca & Giannì, 2017).

A lactoferrina é uma glicoproteína do leite materno com efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios, é a principal glicoproteína com atividade antipatogênica no leite materno, um elemento que fornece imunidade inata que é transferida para os bebês amamentados e é fundamental na formação e desenvolvimento de seu sistema imunológico imaturo, é a proteína mais abundante na fração de soro de leite (Villavicencio et al., 2017). É crucial na prevenção de diarreia, sepse neonatal e enterocolite necrosante em prematuros, também apresenta efeito antiviral de que é observado na fase inicial da infecção por inibição do crescimento de vírus (Queiroz et al., 2013).

Quanto aos carboidratos, eles exercem importante função na nutrição da criança, são ingeridos pelos lactentes na forma de lactose, é considerada de grande importância para o organismo do RN e do lactente, pois a galactose, que é seu produto metabólico, faz parte da constituição dos galactolipídeos, que são integrantes do sistema nervoso central, proporcionando o seu desenvolvimento (Kim & Yi, 2020).

Os micronutrientes encontrados no leite materno como as vitaminas e os minerais, são variados e dependem da dieta da mãe, por isso é recomendada a complementação da dieta materna com multivitaminas durante a lactação, além de uma alimentação saudável (Ballard & Morrow, 2013).

Além de todos os nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento dos lactentes e proteção imunológica, o leite humano contém numerosos compostos bioativos com propriedades antioxidantes que protegem contra infecções e reduzem sua gravidade, como enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, vitaminas E e C, retinol e beta caroteno (Kim & Yi, 2020). A capacidade antioxidante do leite materno é relevante para os recém nascidos, pois estes sofrem grande estresse oxidativo, eles saem de um meio com baixas concentrações de oxigênio para um meio com concentrações consideradas normais (Nogueira et al., 2018).

A composição lipídica, constitui a maior fonte de energia, corresponde a 44% da energia total fornecida pelo leite materno, contém nutrientes essenciais e exerce papel importante na saúde dos bebês, estudos comprovam que eles, inativam vários patógenos *in vitro*, inclusive o *Streptococcus sp.* do Grupo B, fazendo com que o organismo fique protegido de infecções invasivas, além disso, afeta positivamente o desenvolvimento funcional cortical da retina e do cérebro (Andreas et al., 2015).

Os ácidos graxos principais encontrados no leite humano, são os ácidos láurico, mirístico, palmítico, palmitoléico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico. Sendo os linoleico e linolênico, considerados ácidos graxos essenciais, de cadeia longa, cujo RN pré-termo, possui capacidade limitada para sintetizá-los, sendo importante sua oferta a partir do leite humano (Calil et al., 2003).

O ácido docosahexaenóico (DHA) pode ser sintetizado apenas em uma extensão limitada em seres humanos a partir do ácido α -linolênico (ALA) do ácido graxo n-3 essencial (Plaza-Díaz et al., 2018). O DHA é um nutriente de extrema importância para o desenvolvimento normal dos bebês, desempenha papéis essenciais na estrutura e função da retina e do sistema nervoso central e se acumula rapidamente *nesses tecidos, tanto* na gestação quanto durante o estágio inicial da infância, os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFAs) com comprimentos de cadeia de 20 a 22 átomos de carbono desempenham um papel essencial no crescimento e na maturação do sistema nervoso durante a infância (Auestad et al., 2003). O aleitamento materno contribui para a obtenção desse ácido

graxo, já que a maioria dos requisitos humanos para o DHA deve ser satisfeita por meios alimentares (Huang et al., 2013).

O DHA é o ácido graxo mais abundante na membrana foto receptora da retina e junto com o ácido araquidônico, compõe a membrana fosfolipídica das células, atuando no sistema visual (Markiewicz Mancio KUS et al., 2011). Os LCPUFAs exibem ações citoprotetoras e citoterapêuticas, contribuindo para uma série de mecanismos antiangiogênicos e neuroprotetores na retina, eles podem modular processos metabólicos e atenuar os efeitos de exposições ambientais que ativam moléculas presentes na patogênese de doenças retinianas vasoproliferativas e neurodegenerativas (SanGiovanni & Chew, 2005).

Sabe-se que o leite materno tem importante função e composição antioxidante, que é essencial para proteger e prevenir contra doenças da infância. Desta forma é essencial que o lactente obtenha antioxidantes através da alimentação, que nos bebês se dá através do aleitamento materno.

A produção de agentes pró-oxidantes, como espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, fazem parte do metabolismo humano e de suas funções fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor (VASCONCELOS et al., 2007). No entanto, quando sua produção é excessiva podem levar a lesões oxidativas, causando efeitos potencialmente danosos para o DNA, proteínas, carboidratos e lipídios, ocorrendo a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, que destroem a função normal da membrana e dos receptores celulares pela oxidação (França et al., 2013). Quando ocorre essa produção excessiva, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio, evitando o estresse oxidativo (Gomes et al., 2005). O aumento da peroxidação lipídica causada pelo aumento de radicais livres é apontada como sendo um dos mecanismos patogênicos para as doenças causadas por radicais livres do oxigênio, como retinopatia da prematuridade, doença pulmonar crônica e enterocolite necrotizante (Gomes et al., 2005). Desta forma, o aleitamento materno contribui, para prevenir esse processo de oxidação, combatendo os radicais livres.

Nos últimos anos várias fórmulas lácteas estão sendo fabricadas utilizando compostos químicos presentes no leite materno; mas apesar da semelhança, as

fórmulas não conseguem se igualar ao leite materno, especialmente pela sua característica de filtrado sanguíneo, visto que além de todos os benefícios já citados, como sua atividade imunológica, ele ainda é utilizado como coadjuvante no tratamento de lactentes de risco como RN pré-termo, com doenças neurológicas, gastrointestinais e outras (Kim & Yi, 2020). A prematuridade é um dos maiores fatores de morbidade no RN, sendo o estresse oxidativo um dos seus principais problemas, visto que esses neonatos estão mais expostos ao estresse oxidativo, devido a possibilidade maior de infecção, oxigenoterapia, ventilação mecânica, nutrição parenteral e transfusões de sangue, fatores que causam desequilíbrio entre capacidade antioxidante e estresse oxidativo (Păduraru et al., 2018).

Existem algumas situações em que as mães podem estar impedidas de amamentar, então o leite humano deve ser coletado através de doações e processado em bancos de leite humano, e para ser usado deve passar por procedimentos que garantam qualidade nutricional e microbiológica, para que seja benéfico para o RN, porém a capacidade antioxidante pode ser afetada pelo tratamento térmico e armazenamento (Nogueira et al., 2018). Muitos componentes do leite mudam com o armazenamento, como as células imunes e os lipídios. Quando às gorduras do leite, ocorre a formação de peróxidos, decorrentes da atividade da lipase durante o armazenamento, fazendo com que ocorra uma maior degradação do leite humano, interferindo na sua qualidade (Păduraru et al., 2018). A capacidade antioxidante do leite materno é superior a das fórmulas lácteas, e a garantia do aleitamento materno para os bebês previne diversas doenças, tanto na infância, quanto na vida adulta (Nogueira et al., 2018).

É importante avaliar a atividade antioxidante do leite materno e sua manutenção relacionada ao armazenamento para que o leite seja ofertado com qualidade e segurança para o RN. Um estudo realizado em 2004, avaliou o efeito do resfriamento e congelamento (-20°C), por um período de 2 a 7 dias, constatando que a atividade antioxidante do leite materno determinada pelo método ABTS, diminuiu significativamente após refrigeração e congelamento (Hanna, 2004). Outro estudo foi realizado com foco no tempo de armazenamento do leite, onde os resultados indicaram que o congelamento induziu perdas nas propriedades antioxidantes do leite materno e concluiu que, para preservar ao máximo as propriedades antioxidantes do leite materno, ele deve ser armazenado a -80°C por um período inferior a 30 dias (Silvestre et al., 2010).

Em 2018, uma pesquisa constatou que quanto à capacidade antioxidante, houve uma redução de 52,73% aos 14 dias de congelamento e o congelamento por 7 dias diminuiu a capacidade antioxidante em 45,99%. Quando avaliado no método ABTS, a capacidade antioxidante não sofreu significativa interferência, entre 07 e 14 dias de congelamento (Nogueira et al., 2018). Um estudo realizado na Romênia, também em 2018, demonstrou que o congelamento por 12 semanas reduziu mais de 50% do total antioxidante quando comparado ao leite fresco, comprovando que a amamentação continua sendo essencial para ajudar na proteção contra os radicais livres, espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, sendo que o leite fresco possui mais altos níveis de antioxidantes, entretanto, quando não for possível a oferta do leite fresco, é preferível refrigerar por 72 horas, do que congelar (Păduraru et al., 2018). Mais recentemente, em 2019, foi realizado um estudo com amostras de leite congelado por 72 horas, onde concluiu-se que o leite após congelamento também diminuiu sua atividade antioxidante, e que o leite fresco, possuiu o mais alto nível de oxidantes (Konak et al., 2019).

Muito se tem pesquisado sobre leite materno, o efeito do armazenamento, fatores relacionados aos efeitos bacteriológicos, nutricionais e imunológicos, porém sobre os efeitos do congelamento e capacidade antioxidante a maioria dos artigos ressaltam a importância de pesquisar mais sobre o assunto por ser pouco explorado e ter muitos estudos inconclusivos. Neste contexto, nossa proposta é avaliar o efeito do congelamento sobre a capacidade antioxidante e o perfil pró-oxidante do leite materno, garantindo que os lactentes recebam leite materno de qualidade. Nossa hipótese é que o tempo de congelamento afetará a composição do leite o que levará à diminuição ou perda da qualidade.

REFERÊNCIAS

- Aksu, T., Atalay, Y., Türkyilmaz, C., Gülbahar, Ö., Hirfanoğlu, I. M., Demirel, N., Önal, E., Ergenekon, E., & Koç, E. (2015). The effects of breast milk storage and freezing procedure on interleukine-10 levels and total antioxidant activity. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 28(15), 1799–1802. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.968844>
- Alves, J. de S., Oliveira, M. I. C. de, & Rito, R. V. V. F. (2018). Guidance on breastfeeding in primary health care and the association with exclusive breastfeeding. *Ciencia e Saude Coletiva*, 23(4), 1077–1088. <https://doi.org/10.1590/1413-81232018234.10752016>
- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Mehring Le-Doare, K. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. In *Early Human Development*. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- Auestad, N., Scott, D. T., Janowsky, J. S., Jacobsen, C., Carroll, R. E., Montalto, M. B., Halter, R., Qiu, W., Jacobs, J. R., Connor, W. E., Connor, S. L., Taylor, J. A., Neuringer, M., Fitzgerald, K. M., & Hall, R. T. (2003). Visual, cognitive, and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1542/peds.112.3.e177>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. In *Pediatric Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Bardanzellu, F., Fanos, V., & Reali, A. (2017). Omics in human colostrum and mature milk: Looking to old data with new eyes. *Nutrients*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/nu9080843>
- Bertino, E., Giribaldi, M., Baro, C., Giancotti, V., Pazzi, M., Peila, C., Tonetto, P., Arslanoglu, S., Moro, G. E., Cavallarin, L., & Gastaldi, D. (2013). Effect of prolonged refrigeration on the lipid profile, lipase activity, and oxidative status of human milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(4), 390–396. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31827af155>
- Bertino, E., Peila, C., Cresi, F., Maggiora, E., Sottemano, S., Gazzolo, D., Arslanoglu, S., & Coscia, A. (2018). Donor human milk: Effects of storage and heat treatment on oxidative stress markers. *Frontiers in Pediatrics*, 6(October), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00253>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- BRASIL. Ministério da Saúde. (2009). SAÚDE DA CRIANÇA: Nutrição Infantil: aleitamento materno e alimentação complementar. In *Cadernos de Atenção Básica*.
- BRASIL, M. da S. (2015). *CADERNOS DE ATENÇÃO BÁSICA Nº 23*.

- Bravi, F., Wiens, F., Decarli, A., Dal Pont, A., Agostoni, C., & Ferraroni, M. (2016). Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: A systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 104(3), 646–662. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.120881>
- Butts, C. A., Paturi, G., Blatchford, P., Bentley-Hewitt, K. L., Hedderley, D. I., Martell, S., Dinnan, H., Eady, S. L., Wallace, A. J., Glyn-Jones, S., Wiens, F., Stahl, B., & Gopal, P. (2020). Microbiota composition of breast milk from women of different ethnicity from the Manawatu—Wanganui region of New Zealand. *Nutrients*, 12(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu12061756>
- Bzikowska-Jura, A., Czerwonogrodzka-Senczyna, A., Olędzka, G., Szostak-Węgierek, D., Weker, H., & Wesołowska, A. (2018). Maternal nutrition and body composition during breastfeeding: Association with human milk composition. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu10101379>
- Cacho, N. T., & Lawrence, R. M. (2017). Innate immunity and breast milk. In *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00584>
- Calil, V. M., Tuma, L., & Falcão, M. C. (2003). Composição do leite humano: o alimento ideal. *Revista de Medicina*, 82(1–4), 1–10. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v82i1-4p1-10>
- Cascone, D., Tomassoni, D., Napolitano, F., & Di Giuseppe, G. (2019). Evaluation of knowledge, attitudes, and practices about exclusive breastfeeding among women in Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph16122118>
- Czosnykowska-Łukacka, M., Orczyk-Pawilowicz, M., Broers, B., & Królak-Olejniak, B. (2019). Lactoferrin in human milk of prolonged lactation. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu11102350>
- França, B. K., Melo Alves, M. R., Silveira Souto, F. M., Tiziane, L., Freire Boaventura, R., Guimarães, A., & Alves, A. (2013). Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *GE Jornal Português de Gastrenterologia*. <https://doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>
- Gila-Díaz, A., Carrillo, G. H., Cañas, S., Pipaón, M. S. de, Martínez-Orgado, J. A., Rodríguez-Rodríguez, P., de Pablo, Á. L. L., Martín-Cabrejas, M. A., Ramiro-Cortijo, D., & Arribas, S. M. (2020). Influence of maternal age and gestational age on breast milk antioxidants during the first month of lactation. *Nutrients*, 12(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu12092569>
- Gomes, M. M., Saunders, C., & Accioly, E. (2005). Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. <https://doi.org/10.1590/s1519-38292005000300003>
- Hanna, N. (2004). Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 89(6), F518–F520. <https://doi.org/10.1136/ad.2004.049247>
- Howland, V., Klaedtke, M., Ruhnau, J., Dhople, V. M., Grabe, H. J., Völker, U., Heckmann, M., & Hammer, E. (2020). Impact of storage conditions on the breast milk peptidome. *Nutrients*, 12(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu12092733>

- Huang, H. L., Chuang, L. Te, Li, H. H., Lin, C. P., & Glew, R. H. (2013). Docosaheptaenoic acid in maternal and neonatal plasma phospholipids and milk lipids of Taiwanese women in Kinmen: Fatty acid composition of maternal blood, neonatal blood and breast milk. *Lipids in Health and Disease*.
<https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-27>
- Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K., & Jouyban, A. (2015). Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BiolImpacts*, 5(3), 123–127. <https://doi.org/10.15171/bi.2015.20>
- Kim, S. Y., & Yi, D. Y. (2020). Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clinical and Experimental Pediatrics*.
<https://doi.org/10.3345/cep.2020.00059>
- Koletzko, B. (2017). Human milk lipids. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 69(2), 28–40. <https://doi.org/10.1159/000452819>
- Konak, M., Minici, M., Tarakçı, N., Altunhan, H., Toker, A., & Örs, R. (2019). Effects of the storage of breast milk at different temperatures on total antioxidant capacity, total oxidant status, and paraoxonase-1 level. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 61(1), 1. <https://doi.org/10.24953/turkjpmed.2019.01.001>
- Krol, K. M., & Grossmann, T. (2018). Psychological effects of breastfeeding on children and mothers. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 61(8), 977–985. <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2769-0>
- Lönnerdal, B., Erdmann, P., Thakkar, S. K., Sauser, J., & Destailats, F. (2017). Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 41, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.06.001>
- Markievicz Mancio KUS, M., AUED-PIMENTEL, S., & MANCINI-FILHO, J. (2011). Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais. *Brazilian Journal of Food Technology*.
<https://doi.org/10.4260/bjft2011140200019>
- Mosca, F., & Gianni, M. L. (2017). Human milk: composition and health benefits. In *La Pediatria medica e chirurgica : Medical and surgical pediatrics*.
<https://doi.org/10.4081/pmc.2017.155>
- Nogueira, J. A. V., Santos, M. M. de O., Passos, M. C., Cunha, L. R. da, Parreiras, P. M., & Menezes, C. C. (2018). Stability of Antioxidant Capacity of Human Milk after Freezing and Pasteurization. *Journal of Food and Nutrition Research*, 6(7), 450–455. <https://doi.org/10.12691/jfmr-6-7-5>
- Nunes, L. M. (2015). Importância do aleitamento materno na atualidade. *Boletim Científico de Pediatria*.
- Ongprasert, K., Ruangsuriya, J., Malasao, R., Sapbamrer, R., Suppansan, P., Ayood, P., Kittisakmontri, K., & Siviroj, P. (2020). Macronutrient, immunoglobulin a and total antioxidant capacity profiles of human milk from 1 to 24 months: a cross-sectional study in Thailand. *International Breastfeeding Journal*, 15(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s13006-020-00333-5>
- Órfão, A., & Gouveia, C. (2009). Apontamentos de anatomia e fisiologia da lactação.

- Revista Portuguesa de Clínica Geral*, 25(3), 356–362.
<https://doi.org/10.32385/rpmgf.v25i3.10631>
- Păduraru, L., Dimitriu, D. C., Avasiloaiei, A. L., Moscalu, M., Zonda, G. I., & Stamatina, M. (2018). Total antioxidant status in fresh and stored human milk from mothers of term and preterm neonates. *Pediatrics and Neonatology*, 59(6), 600–605.
<https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2018.02.004>
- Plaza-Díaz, J., Fontana, L., & Gil, A. (2018). Human milk oligosaccharides and immune system development. *Nutrients*, 10(8).
<https://doi.org/10.3390/nu10081038>
- Pozzo, L., Cirrincione, S., Russo, R., Karamač, M., Amarowicz, R., Coscia, A., Antoniazzi, S., Cavallarin, L., & Giribaldi, M. (2019). Comparison of oxidative status of human milk, human milk fortifiers and preterm infant formulas. *Foods*, 8(10), 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods8100458>
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402.
<https://doi.org/10.1021/jf9913458>
- Queiroz, V. A. de O., Assis, A. M. O., & da Costa, H. R. (2013). Efeito protetor da lactoferrina humana no trato gastrointestinal. In *Revista Paulista de Pediatria*.
<https://doi.org/10.1590/S0103-05822013000100015>
- Raoof, N. A., Adamkin, D. H., Radmacher, P. G., & Telang, S. (2016). Comparison of lactoferrin activity in fresh and stored human milk. *Journal of Perinatology*, 36(3), 207–209. <https://doi.org/10.1038/jp.2015.186>
- Rice-Evans, C., & Miller, N. J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234(C), 279–293. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34095-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34095-1)
- SanGiovanni, J. P., & Chew, E. Y. (2005). The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. In *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.06.002>
- Silvestre, D., Miranda, M., Muriach, M., Almansa, I., Jareño, E., & Romero, F. J. (2010). Frozen Breast Milk at -20°C and -80°C: A Longitudinal Study of Glutathione Peroxidase Activity and Malondialdehyde Concentration. *Journal of Human Lactation*, 26(1), 35–41. <https://doi.org/10.1177/0890334409342987>
- Thai, J. D., & Gregory, K. E. (2020). Bioactive factors in human breast milk attenuate intestinal inflammation during early life. *Nutrients*, 12(2), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/nu12020581>
- Tijerina-Sáenz, A., Innis, S. M., & Kitts, D. D. (2009). Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and e and fatty acid composition. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01437.x>
- Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. D. F., Manfredini, V., Benfato, M. D. S., & Kubota, L. T. (2007). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais

- métodos analíticos para sua determinação. *Quimica Nova*, 30(5), 1323–1338. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422007000500046>
- Villavicencio, A., Rueda, M. S., Turin, C. G., & Ochoa, T. J. (2017). Factors affecting lactoferrin concentration in human milk: How much do we know? *Biochemistry and Cell Biology*, 95(1), 12–21. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0060>
- Wesolowska, A., Brys, J., Barbarska, O., Strom, K., Szymanska-Majchrzak, J., Karzel, K., Pawlikowska, E., Zielinska, M. A., Hamulka, J., & Oledzka, G. (2019). Lipid profile, lipase bioactivity, and lipophilic antioxidant content in high pressure processed donor human milk. *Nutrients*, 11(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu11091972>
- Wu, K., Zhu, J., Zhou, L., Shen, L., Mao, Y., Zhao, Y., Gao, R., Lou, Z., Cai, M., & Wang, B. (2020). Lactational changes of fatty acids and fat-soluble antioxidants in human milk from healthy Chinese mothers. *British Journal of Nutrition*, 123(8), 841–848. <https://doi.org/10.1017/S0007114520000239>
- Yundelfa, M., Mayetti, M., & Lipoeto, N. I. (2018). Effect of Duration and Temperatur Breastmilk Storage and The way of Diluting Breastmilk on Protein and Fat Levels in Breastmilk. *Journal of Midwifery*, 3(1), 72. <https://doi.org/10.25077/jom.1.1.72-83.2018>

Manuscrito (em revisão)

Journal of Human Lactation (IF 2.219 Qualis CAPES A3)

The time and temperature of breast milk storage influences the antioxidant properties and malondialdehyde concentration

Vania Paula Damasceno Ribeiro, MS¹, Renata Braga Tinoco, MS², Ana Luísa Beber Chamon, MS², Tamires Cruz dos Santos, PhD¹, Racire Sampaio Silva, PhD², Marcio Fronza PhD^{1,3*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha, Vila Velha, Brazil.

²Curso de Medicina, Universidade Vila Velha, Vila Velha, Brazil.

^{1,3}Pesquisador Sênior, Instituto Capixaba de Ciências e Administração (ICCA), Vila Velha, Brazil.

Funding statement: Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (Decit/SCTIE/MS) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of interest statement: The authors declare that they have no conflict of interest.

Correspondence concerning this article should be addressed to Marcio Fronza, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha – UVV, Av. Comissário José Dantas de Melo, nº21, Boa Vista, Vila Velha, ES, 29102-920, Brazil. *E-mail:* marcio.fronza@uvv.br.

RESUMO

Introdução: O leite materno é uma importante fonte de nutrição para o lactente, sendo o alimento essencial para a saúde, crescimento do bebê e proteção contra inúmeras doenças. Visto que em algumas ocasiões as mães estão impossibilitadas de amamentar, é necessário que elas armazenem o leite para ser oferecido ao bebê no momento da sua ausência. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade dos perfis antioxidante, pró-oxidante e o teor de proteínas no leite materno fresco e após diferentes tempos e temperaturas de armazenamento, para que o leite armazenado seja oferecido com qualidade para o lactente. Nossa hipótese é que o tempo de armazenamento afeta a composição do leite, levando à diminuição ou perda da qualidade. **Método:** Foram selecionadas para a pesquisa uma amostra de 20 lactantes, maiores de 18 anos que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o TCLE. A atividade antioxidante do leite materno foi determinada pelos métodos do sequestro do radical livre (ABTS) e pelo método da redução do Ferro (FRAP). O estresse oxidativo foi avaliado pelo nível de peroxidação lipídica por meio da dosagem de malondialdeído (MDA) e pelo teor de proteínas totais. **Resultados:** Os resultados encontrados indicam que o perfil antioxidante do leite materno, tanto no ABTS como no FRAP se mantiveram até o 14º dia, ocorrendo uma diminuição significativa no 21º dia de armazenamento em ambas as temperaturas. A atividade oxidante, quando o leite foi armazenado a uma temperatura de -20°C, não apresentou alteração. Porém quando armazenado a 4°C, apresentou um aumento gradual, com diferença significativa no 21º dia. Não houve alteração no valor do teor de proteínas totais. **Conclusão:** Mesmo com o armazenamento a atividade antioxidante só apresentou uma diminuição significativa no 21º dia de armazenamento em ambas as temperaturas (4°C e - 20°C), o que sugere que até o 14º de armazenamento o leite preserva suas propriedades antioxidantes. Em relação aos marcadores de peroxidação lipídica pelo método utilizado o leite pode ser armazenado por até 21 dias a uma temperatura de -20 °C e quando armazenado a 4°C, por um período de 14 dias. Quanto ao teor de proteínas o presente estudo não mostrou alteração, tanto a 4°C, quanto a - 20°C, em todos os tempos de armazenamento.

Palavras-chave: amamentação; estresse oxidativo; peroxidação lipídica; potencial antioxidante; armazenamento.

1. INTRODUÇÃO

O leite materno é considerado um alimento ideal para os bebês (BRASIL, 2015), é o único alimento que contém anticorpos e células vivas, que reduz o risco de infecções e doenças nos bebês, como diarreia, infecções respiratórias e otites, além de possuírem compostos com ação antioxidante que também proporcionam proteção contra doenças (Cacho & Lawrence, 2017; Cascone et al., 2019; Ongprasert et al., 2020; Thai & Gregory, 2020). Em alguns casos o leite precisa ser armazenado para posteriormente ser oferecido ao lactente sendo importante avaliar as condições de armazenamento, como o tempo e a temperatura, para que suas características antioxidantes sejam preservadas impedindo a oxidação e degradação dos ácidos graxos essenciais e de proteínas não inferindo assim na sua composição e consequentemente na saúde do lactente, garantindo para ele um alimento saudável e de qualidade (Bertino et al., 2018; Hanna, 2004; Howland et al., 2020).

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFA), ácido docosahexaenoico (DHA) e ácido araquidônico (AA), desempenham um papel essencial no crescimento e na maturação do sistema nervoso e visual durante a infância (Koletzko, 2017; Wesolowska et al., 2019; Wu et al., 2020). O aleitamento materno contribui para a obtenção desses ácidos graxos, já que a maioria dos requisitos humanos para a obtenção dos mesmos devem ser satisfeitas por meios alimentares (Garwolińska et al., 2018).

Outro componente do leite de extrema importância para o lactente, são as proteínas, que apresentam diversas funções que contribuem para os benefícios do aleitamento materno, atuam no desenvolvimento intestinal (fatores de crescimento, lactoferrina) e absorção de nutrientes (lipase estimulada pelo sal biliar, amilase, alfa1-antitripsina) e possuem atividade imune e antimicrobiana (lactoferrina, IgA secretora, osteopontina, citocinas, lisozima, etc.) (Ballard & Morrow, 2013; Butts et al., 2020; Bzikowska-Jura et al., 2018; Czosnykowska-Lukacka et al., 2019; Lönnerdal et al., 2017; Thai & Gregory, 2020).

Desta forma, o estudo dos componentes do leite materno encontra vasto campo de estudo. Tais compostos, principalmente aqueles com potencial antioxidante, tem função de neutralizar os radicais livres produzidos durante o estresse oxidativo e que, consequentemente, iriam causar ainda mais prejuízo para a saúde da criança, como problemas no desenvolvimento, cardiopulmonares, neurais e até mesmo doenças

infecciosas (Bertino et al., 2013; Nogueira et al., 2018; Păduraru et al., 2018). A partir dessa ótica, é preciso entender como prolongar o período de oferta de leite materno para os bebês, quando as mães encontrarem alguma dificuldade para amamentar diretamente pela mama e precisa armazená-lo para ser oferecido posteriormente.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade do leite humano relacionada aos perfis antioxidantes, pró oxidante e teor de proteínas totais, após diferentes tempos e temperaturas de armazenamento em condições domésticas, para que o leite armazenando seja oferecido com qualidade e segurança para o lactente. Nossa hipótese é que o tempo de armazenamento prolongado afeta a composição do leite, levando à diminuição ou perda da qualidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Participantes e questões éticas

O estudo incluiu 20 voluntárias que estavam amamentando, com idade entre 18 e 41 anos que concordaram em participar da pesquisa. Os critérios de exclusão foram: presença de doença grave, uso de drogas ilícitas, uso de antibióticos e outros medicamentos. Foi aplicado às participantes um questionário sobre os períodos do parto, conhecimentos sobre amamentação, o que incluía aspectos desde o pré-natal, tipo de parto até a alimentação materna pós-parto (anexo B). Trata-se de um estudo transversal, que foi realizado no período de janeiro a março de 2021 na região da Grande Vitória no estado do Espírito Santo, Brasil. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade de Vila Velha (Número do Parecer: 4.282.003). Todas as voluntárias que concordaram em participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE).

2.2 Coleta de Material e Armazenamento

De cada mãe foi coletada uma amostra de pelo menos 10 ml de leite materno por ordenha manual e armazenado em frasco de vidro âmbar (escuro), para evitar processos oxidativos durante o trajeto. As amostras de leite materno foram coletadas nas casas das moradoras dos municípios de Cariacica e Vila Velha e imediatamente transportadas em caixa isotérmica à temperatura entre 3,5 °C e 4°C, até o laboratório da Universidade Vila Velha e posteriormente foram divididas em alíquotas em 3 grupos: no primeiro grupo as amostras foram avaliadas aproximadamente 120 minutos após coleta (leite fresco, dia 1), no segundo grupo as alíquotas foram armazenadas em refrigerador a 4°C e no terceiro grupo em freezer a -20°C para posterior avaliação. Para todas as amostras coletadas, a diferença entre o tempo de coleta, armazenamento e análise do leite fresco (dia 1), foi entre 1 e 2 horas.

2.3 Fracionamento das amostras

As amostras coletadas de cada voluntária foram divididas em 11 alíquotas de 0,5 ml cada. As alíquotas foram divididas em 3 grupos: no primeiro grupo as amostras foram analisadas no dia da coleta em tempo inferior a 2 horas após coleta. No segundo grupo as alíquotas foram armazenadas a 4°C e no terceiro grupo a -20°C para

posteriores análises bioquímicas. As análises foram realizadas no dia da coleta, em seguida nos tempos de 1, 2, 7, 14 e 21 dias após armazenamento.

Após cada respectivo período de armazenamento, alíquotas foram deixadas à temperatura ambiente por 30 minutos em local escuro em seguida procedeu-se a realização dos ensaios biológicos descritos abaixo.

3.0 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.1 Determinação da atividade antioxidante do leite materno

3.1.1 Sequestro do radical livre ABTS

A atividade antioxidante foi determinada nas amostras de leite pelo método do sequestro do radical livre ABTS por ser um dos mais utilizados para determinação de atividade antioxidante em fluidos biológicos (Rice-Evans & Miller, 1994). As amostras de leite foram inicialmente diluídas com água deionizada (1:10) e uma alíquota de 30 µL foi transferida para uma placa de 96 poços de fundo chato. Os radicais livres presentes no leite materno foram quantificados pela reação da amostra com o ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico. Desta diluição (1/10) foram retirados 30 µL, que foram colocados em seus determinados poços, foi acrescentado 270 µL de solução ABTS, em ambiente escuro. Para o controle negativo, foi usado 30 µL de água ultrapura com 270 µL do reagente ABTS. Foi utilizado a leitora de microplacas (ELISA) na absorbância de 734nm para a leitura dos resultados. O método foi realizado em triplicata. Os resultados são expressos como valores médios $\pm$ erro padrão da média em porcentagem de inibição do radical ABTS ($n = 20$). * $p < 0,05$ comparado ao leite fresco (D0).

3.1.2 Antioxidante Total pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)

A atividade antioxidante também foi analisada pela determinação do poder de redução do íon ferro (FRAP) que está baseado na produção do íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) (Pulido et al., 2000). Foram utilizadas alíquotas de 30 µL da diluição do leite (1:10) junto com 270 µL do reagente FRAP para quantificar o poder antioxidante. A solução utilizada era feita no dia de análise. No branco, foi usado 30 µL de água destilada com 270 µL do reagente FRAP. Após 10 minutos de reação em ambiente escuro, foi realizada a leitura na leitora de microplacas (ELISA) na absorbância de 595 nm. Cada análise foi feita em triplicata. Os resultados são expressos como valores médios $\pm$ erro padrão da média em

porcentagem de inibição pelo método de redução do ferro (FRAP) (n = 20). * $p < 0,05$ comparado ao leite fresco (D0).

3.2 Determinação da atividade pró-oxidante do leite materno

3.2.1 Determinação do malondialdeído (MDA)

O nível de peroxidação lipídica, que está relacionado com o estresse oxidativo, foi avaliado usando o malondialdeído (MDA) que reage com o ácido tiobarbitúrico para produzir um complexo vermelho (Vasconcelos et al., 2007). Foram utilizadas alíquotas de amostra de 100 μ L de diluição do leite (1:10) e foi misturado com 500 μ L de ácido tricloroacético (15%) e hidroximetil tolueno butilado (45mM), homogeneizado e aquecido a 100°C, durante 15 min. O homogeneizado foi centrifugado (15,000g 2 min) e uma alíquota de 300 μ L do sobrenadante foi recolhido e adicionado ao mesmo volume de ácido tiobarbitúrico (0,73%). As amostras foram incubadas a 100°C durante 30min e a absorbância medida a 540 nm. Cada análise foi feita em triplicata. Os resultados foram expressos em nmol MDA/mg de proteína (Khoubnasabjafari et al., 2015).

3.2.2 Determinação de Proteínas Totais

A determinação de proteínas totais, foi determinada pelo método de Bradford que é uma técnica para determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” B-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas, e expressa como miligramas por mililitro. Soluções padrão de 8-1000 μ g/ml de soro bovino, a albumina (BSA) foi usada para construir curvas padrão antes da medição (Bradford, 1976).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A tabulação de dados foi feita no banco de dados do Excel. A análise estatística foi realizada utilizando o software Graphpad 5.0 (San Diego, CA, EUA 176). Variações estatísticas entre os grupos foram determinadas usando a análise de variância multifatorial (ANOVA) seguidas de teste post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os valores foram expressos como média mais ou menos EPM (erro padrão da média).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

Os bebês das voluntárias possuíam idade entre 4 e 12 meses com um valor médio de 8 meses. Todas as voluntárias participantes do estudo estavam produzindo leite maduro. O leite foi coletado pela manhã, após o bebê ter mamado. Sobre os dados coletados através de questionário, foi observado que apenas 30% das participantes já armazenaram o leite materno para ser ofertado em outro momento para o lactente, o que demonstra que a prática de armazenar o leite ainda é fragilizada, necessitando de orientações sobre a coleta do leite e armazenamento para que o mesmo não perca a qualidade e que o lactente tenha a garantia de continuar amamentando, pois muitos elementos benéficos do leite humano são preservados, mesmo após armazenamento (Bertino et al., 2018; Yundelfa et al., 2018). Desta forma é importante estudar sobre a temperatura e o período adequado de armazenamento do leite, para o mesmo ser fornecido com qualidade para o lactente durante a ausência da mãe.

Dentre as participantes do estudo 45% relataram ter conhecimento sobre o aleitamento materno adquiridos durante o pré-natal o que demonstra que o acesso ao conhecimento contribui para a manutenção do aleitamento materno (Alves et al., 2018). A tabela 01, demonstra as principais características das participantes.

Tabela 1- Principais características das participantes (n = 20).

Características	Quantidade Percentual
Idade	
18-30 anos	5 (25%)
30-40 anos	15 (75%)
Trabalho remunerado	
Não trabalham	2 (10%)
Trabalham	18 (90%)
Escolaridade	
Ensino Fundamental	2 (10%)
Ensino Médio	2 (10%)
Ensino Superior	6 (30%)
Pós-Graduação	10 (50%)

Idade Gestacional de nascimento	
34-37 semanas	2 (10%)
37-42 semanas	18 (90%)
Tipo de parto	
Vaginal	16 (80%)
Cesário	4 (20%)
Orientação sobre aleitamento no pré-natal	
Sim	9 (45%)
Não	8 (40%)
Não responderam	3 (15%)
Apresentou alguma dificuldade para amamentar	
Sim	8(40%)
Não	7(35%)
Não responderam	5(25%)
Armazenamento de leite materno para ser ofertado ao bebê	
Sim	6 (30%)
Não	13 (65%)
Não responderam	1 (5%)

5.2 Atividade antioxidante do leite humano

A atividade antioxidante do leite materno foi determinada pelos métodos ABTS e FRAP por serem os métodos mais utilizados nos estudos para determinação de atividade antioxidante em fluidos biológicos. O ABTS determina a atividade antioxidante através da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e o método do FRAP, determina a capacidade antioxidante por meio da redução do ferro (capacidade redutora do ferro), do complexo Fe^{3+} - TPTZ (ferritripiridiltriazina) para ferroso-tripiri-diltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) (Vasconcelos et al., 2007). Os resultados demonstraram que as propriedades antioxidantes do leite não sofreram alterações significativas até o 14º dia de armazenamento em ambas as temperaturas de armazenamento testadas (4°C e – 20°C), quando utilizados estes métodos de avaliação. Entretanto, a atividade antioxidante foi significativamente inferior em amostras armazenadas pelo período de 21 dias, tanto na temperatura de 4°C, quanto na temperatura de -20°C ($p < 0,05$). Os resultados avaliados pelo método ABTS estão demonstrados na figura 1 e os resultados avaliados pelo método do FRAP se encontram na figura 2.

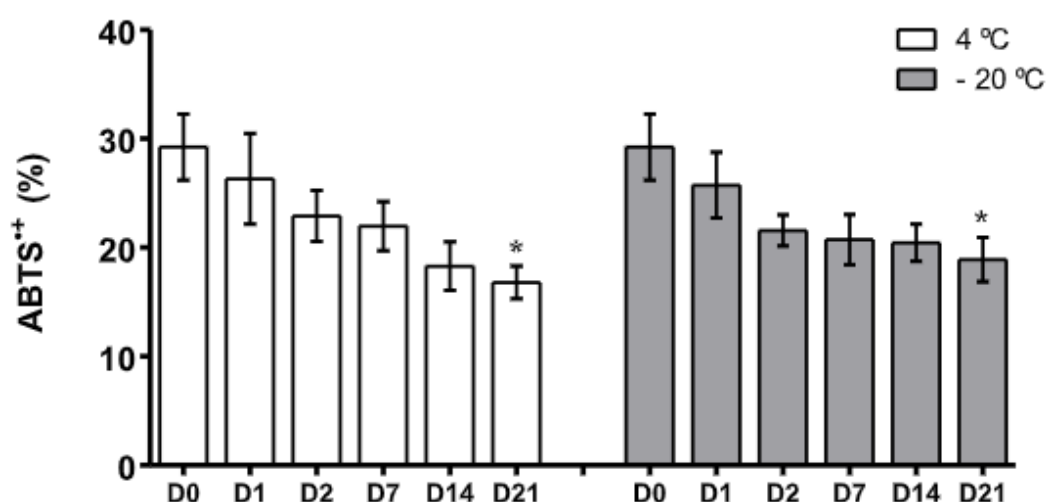


Figura 1. Atividade antioxidante do leite materno determinado pelo método de eliminação do radical ABTS no dia da coleta, considerado leite fresco (D0) e após período de armazenamento de 1 (D1), 2 (D2), 7 (D7), 14 (D14) e 21 (D21) dias nas temperaturas de 4°C e - 20°C. Os resultados são expressos como valores médios $\pm$ erro padrão da média em porcentagem de inibição do radical ABTS (n = 20). * p<0,05 comparado ao leite fresco (D0).

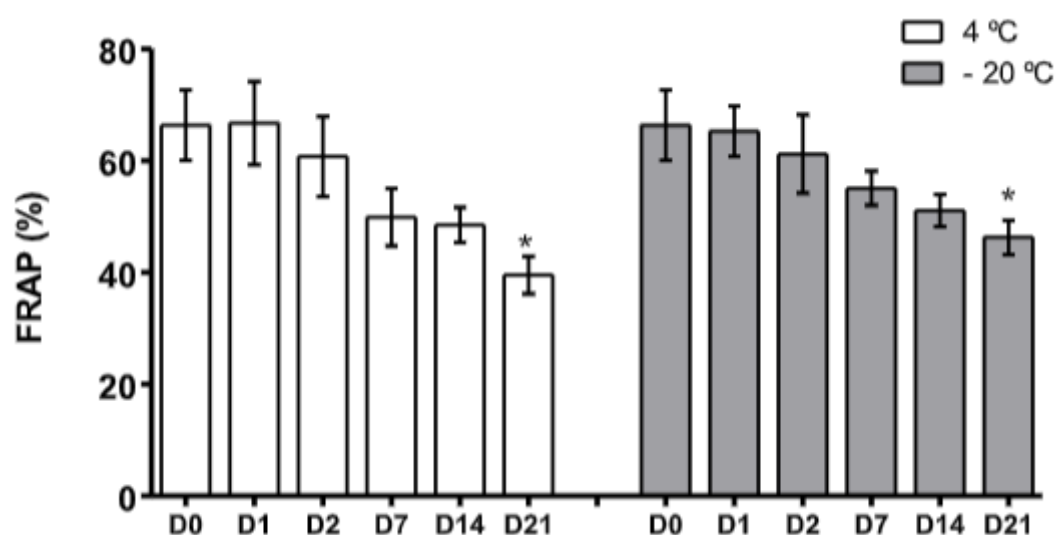


Figura 2. Atividade antioxidante do leite materno determinado pelo método de redução do ferro (FRAP), no dia da coleta (D0), leite fresco e após período de armazenamento de 1 (D1), 2 (D2), 7 (D7), 14 (D14) e 21 (D21) dias nas temperaturas de 4 °C e - 20 °C. Os resultados são expressos como valores médios $\pm$ erro padrão da média em porcentagem de inibição pelo método de redução do ferro (FRAP) (n = 20). * p<0,05 comparado ao leite fresco (D0).

5.3 Atividade pró-oxidante do leite humano (Concentração de MDA)

As amostras de leite materno armazenadas à temperatura de -20 °C por até 21 dias não sofreram peroxidação lipídica determinada pelo método TBARS que avalia a formação do malondialdeído (MDA), considerado um dos produtos finais da peroxidação lipídica e frequentemente usado como uma medida cumulativa deste processo. Entretanto, quando as amostras de leite foram armazenadas à temperatura de 4°C observou-se um aumento gradual da concentração de MDA em função do tempo de armazenamento, com diferença significativa no 21º dia de armazenamento quando comparado ao leite fresco (dia zero) (Figura 3).

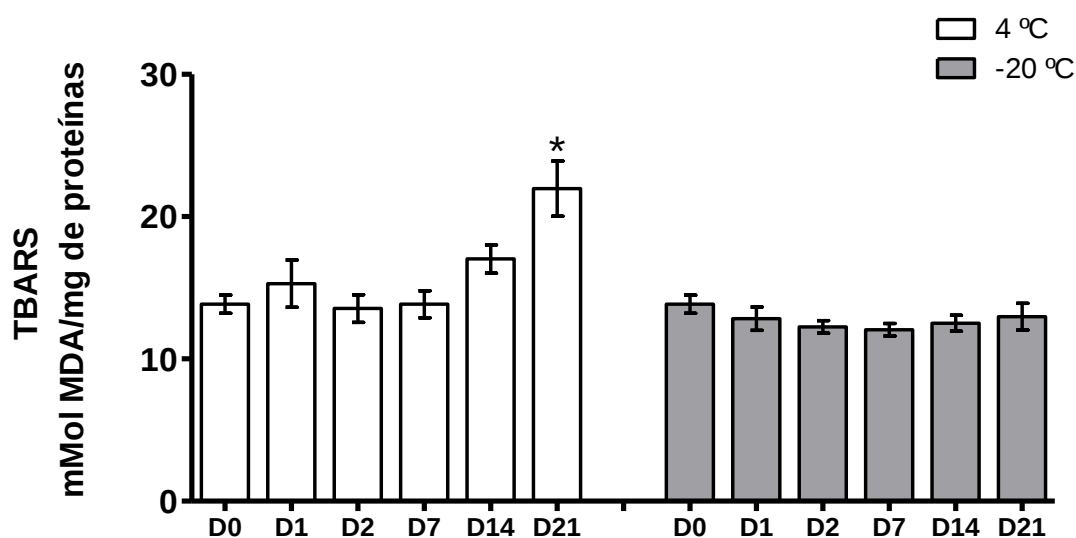


Figura 3. Atividade pró oxidante do leite materno determinado pelo método de substâncias reativas ao tiobarbitúrico ácido (TBARS), no dia da coleta (D0), leite fresco e após período de armazenamento de 1 (D1), 2 (D2), 7 (D7), 14 (D14) e 21 (D21) dias nas temperaturas de 4°C e -20 °C. Os resultados são expressos como valores médios $\pm$ erro padrão da média em nmol de MDA/mg de proteínas obtidas (n=20). * $p < 0,05$ comparado ao leite fresco (D0).

5.4 Dosagem de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais no leite materno realizada pelo método colorimétrico de Bradford, não apresentou alterações significativas em sua composição em ambas as temperaturas (4°C e -20°C) pelo período de até 21 dias de armazenamento (Figura 4).

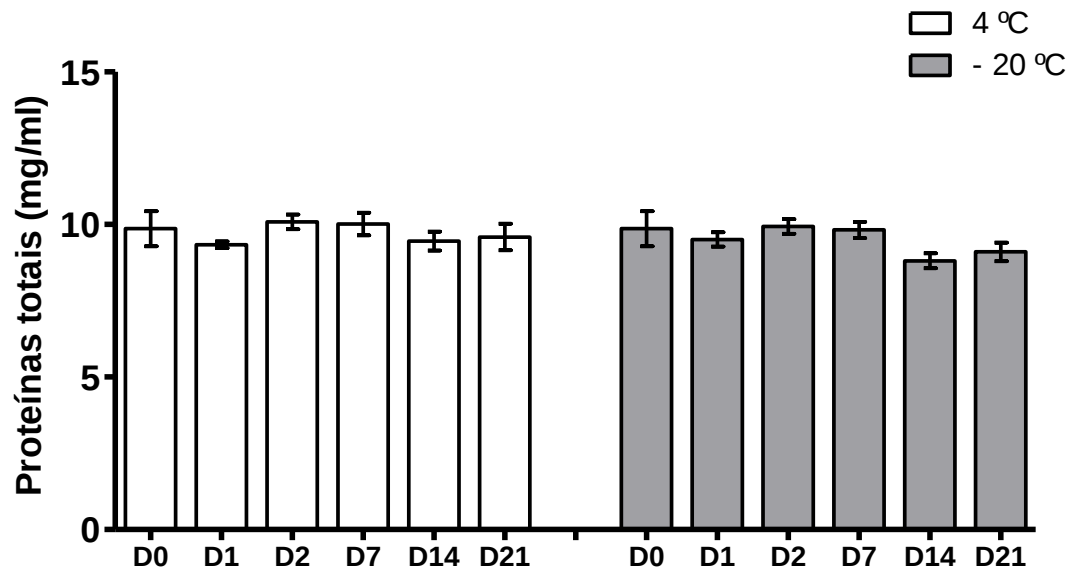


Figura 4. Quantidade de proteínas totais do leite materno determinado pelo método colorimétrico de Bradford, no dia da coleta (D0), leite fresco e após período de armazenamento de 1 (D1), 2 (D2), 7 (D7), 14 (D14) e 21 (D21) dias nas temperaturas de 4 °C e - 20 °C. Os resultados são expressos como valores médios $\pm$ erro padrão da média em em nmol de mg/ml de proteínas totais obtidas (n=20). * $p < 0,05$ comparado ao leite fresco (D0).

6. DISCUSSÃO

A capacidade antioxidante do leite materno tem sido tema de estudos devido sua importância na saúde do lactente por fazer parte do sistema de defesa contra a ação deletéria de radicais livres (Gila-Díaz et al., 2020; Ongprasert et al., 2020; Pozzo et al., 2019; Tijerina-Sáenz et al., 2009; Wesolowska et al., 2019).

Sobre os resultados dos métodos analíticos realizados no presente estudo, os níveis de antioxidantes, quando avaliados pelos métodos do ABTS e FRAP, demonstraram ser significativamente menores quando armazenados por um período de 21 dias em ambas as temperaturas, demonstrando nível de antioxidante mais elevado no leite materno fresco. Estudos que avaliaram a capacidade antioxidante do leite materno relacionado ao tempo de armazenamento, confirmaram que as propriedades antioxidantes do leite fresco diminuem com o armazenamento prolongado (Bertino et al., 2018; Konak et al., 2019; Nogueira et al., 2018; Păduraru et al., 2018). Porém, a maioria dos achados, demonstraram uma perda significativa da atividade antioxidante por um período menor de armazenamento do que o do nosso estudo que identificou uma diminuição significativa de antioxidantes apenas no 21º dia de armazenamento; estes estudos precisam ser confirmados por novas pesquisas nesse âmbito (Nogueira et al., 2018; Păduraru et al., 2018).

A maioria dos estudos que avaliaram a qualidade do leite relacionada à temperatura e armazenamento do leite, utilizaram a temperatura de -20°C e utilizaram o método do ABTS para avaliar a atividade antioxidante (Hanna, 2004; Konak et al., 2019; Păduraru et al., 2018). O mesmo ocorreu ao avaliar o perfil oxidante, onde a maioria dos estudos utilizaram a concentração de MDA, como marcador, assim como no nosso estudo (Bertino et al., 2013; Silvestre et al., 2010).

Confirmando nossos achados, Nogueira et al (2018), avaliou a atividade antioxidante de amostras de leite, pelo método ABTS, concluindo que a capacidade antioxidante não sofreu redução significativa entre 07 dias de congelamento e apresentou uma redução significativa aos 14 dias de armazenamento (Nogueira et al., 2018). Outro estudo também avaliado pelo método ABTS que comparou o leite fresco, com o leite refrigerado armazenado há uma temperatura de 4°C por 1 e 3 dias, demonstrou que o leite materno permanece altamente benéfico em termos de fornecer proteção antioxidante quando refrigerado por até 3 dias (Păduraru et al., 2018).

Outros estudos relacionados a atividade antioxidante do leite após armazenamento, embora as avaliações tenham sido baseadas em outros parâmetros de tempo e temperatura, demonstraram que os níveis de antioxidantes apresentaram uma redução estatisticamente significativa na taxa após armazenamento e que o leite fresco possui o mais alto nível de antioxidantes, porém foi sugerido a necessidade de novos estudos para determinar como o armazenamento afeta as moléculas do leite (Aksu et al., 2015; Bertino et al., 2013; Konak et al., 2019).

A ação oxidante do leite foi avaliada pelo nível de concentração de MDA, que indiretamente avalia a peroxidação lipídica. O presente estudo demonstrou que o leite materno quando armazenado a 4°C apresentou um aumento gradual da peroxidação em função do tempo, com diferença significativa no dia 21 de armazenamento, porém não apresentou diferença significativa quando armazenado a temperatura de -20°C, dessa forma, infere-se que o conteúdo antioxidante do leite pode ter contribuído para minimizar ou diminuir a degradação lipídica e proteica. Corroborando com os achados da pesquisa em questão, Silvestre et al. (2010) notaram que a concentração de MDA, nas amostras de leite após 15 e 30 dias de armazenamento a - 20°C e - 80 °C, não apresentaram mudanças significativas (Silvestre et al., 2010). Bertino et al (2013), avaliou a oxidação do leite humano por 96 horas refrigerado, não sendo observado diferença significativa na oxidação, a peroxidação lipídica só apresentou diferença significativa no dia 21 de armazenamento.

Quanto a avaliação de proteínas, não houve alteração no nível de proteínas do leite quando armazenado, tanto a 4°C, quanto a - 20°C, em todos os tempos de armazenamento. Outros estudos estão condizentes com nossos achados, demonstrando não haver alterações na quantidade de proteínas totais após diferentes tempos de armazenamento do leite em temperaturas de 4°C e -20°C (Howland et al., 2020; Raoof et al., 2016; Yundelfa et al., 2018).

Uma das limitações do estudo foi o pequeno tamanho da amostra, que foi escolhido com base em outros trabalhos publicados, o que demonstra a dificuldade na viabilização de voluntárias para estudos com leite humano. Os efeitos do armazenamento nos marcadores de estresse oxidativo e atividade antioxidante, apresentam dados contrastantes na literatura, o que também demonstra a necessidade de novos estudos.

Os resultados evidenciaram que a capacidade antioxidante do leite humano fresco é maior do que a capacidade do leite armazenado, confirmando a nossa hipótese. Mesmo com o armazenamento a atividade antioxidante só apresentou uma diminuição significativa no 21º dia de armazenamento em ambas as temperaturas (4°C e – 20°C), o que sugere que até o 14º de armazenamento o leite preserva suas propriedades antioxidantes. Em relação aos marcadores de peroxidação lipídica pelos métodos que foram utilizados o leite pode ser armazenado por até 21 dias a uma temperatura de - 20 °C e quando armazenado a 4°C, por um período de 14 dias.

7. CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que a capacidade antioxidante do leite humano fresco é maior do que a capacidade do leite armazenado, confirmando a nossa hipótese. Mesmo com o armazenamento a atividade antioxidante só apresentou uma diminuição significativa no 21º dia de armazenamento em ambas as temperaturas (4°C e -20°C), o que sugere que até o 14º de armazenamento o leite preserva suas propriedades antioxidantes. Em relação aos marcadores de peroxidação lipídica pelo método utilizado o leite pode ser armazenado por até 21 dias a uma temperatura de -20 °C e quando armazenado a 4°C, por um período de 14 dias. Quanto ao teor de proteínas o presente estudo não mostrou alteração após armazenamento, tanto a 4°C, quanto a -20°C, em todos os tempos de armazenamento.

8. REFERÊNCIAS

- Aksu, T., Atalay, Y., Türkyilmaz, C., Gülbahar, Ö., Hirfanoğlu, I. M., Demirel, N., Önal, E., Ergenekon, E., & Koç, E. (2015). The effects of breast milk storage and freezing procedure on interleukine-10 levels and total antioxidant activity. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 28(15), 1799–1802. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.968844>
- Alves, J. de S., Oliveira, M. I. C. de, & Rito, R. V. V. F. (2018). Guidance on breastfeeding in primary health care and the association with exclusive breastfeeding. *Ciencia e Saude Coletiva*, 23(4), 1077–1088. <https://doi.org/10.1590/1413-81232018234.10752016>
- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Mehring Le-Doare, K. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. In *Early Human Development*. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- Auestad, N., Scott, D. T., Janowsky, J. S., Jacobsen, C., Carroll, R. E., Montalto, M. B., Halter, R., Qiu, W., Jacobs, J. R., Connor, W. E., Connor, S. L., Taylor, J. A., Neuringer, M., Fitzgerald, K. M., & Hall, R. T. (2003). Visual, cognitive, and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1542/peds.112.3.e177>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. In *Pediatric Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Bardanzellu, F., Fanos, V., & Reali, A. (2017). Omics in human colostrum and mature milk: Looking to old data with new eyes. *Nutrients*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/nu9080843>
- Bertino, E., Giribaldi, M., Baro, C., Giancotti, V., Pazzi, M., Peila, C., Tonetto, P., Arslanoglu, S., Moro, G. E., Cavallarin, L., & Gastaldi, D. (2013). Effect of prolonged refrigeration on the lipid profile, lipase activity, and oxidative status of human milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(4), 390–396. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31827af155>

- Bertino, E., Peila, C., Cresi, F., Maggiora, E., Sottemano, S., Gazzolo, D., Arslanoglu, S., & Coscia, A. (2018). Donor human milk: Effects of storage and heat treatment on oxidative stress markers. *Frontiers in Pediatrics*, 6(October), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00253>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- BRASIL. Ministério da Saúde. (2009). SAÚDE DA CRIANÇA: Nutrição Infantil: aleitamento materno e alimentação complementar. In *Cadernos de Atenção Básica*.
- BRASIL, M. da S. (2015). *CADERNOS DE ATENÇÃO BÁSICA Nº 23*.
- Bravi, F., Wiens, F., Decarli, A., Dal Pont, A., Agostoni, C., & Ferraroni, M. (2016). Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: A systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 104(3), 646–662. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.120881>
- Butts, C. A., Paturi, G., Blatchford, P., Bentley-Hewitt, K. L., Hedderley, D. I., Martell, S., Dinnan, H., Eady, S. L., Wallace, A. J., Glyn-Jones, S., Wiens, F., Stahl, B., & Gopal, P. (2020). Microbiota composition of breast milk from women of different ethnicity from the Manawatu—Wanganui region of New Zealand. *Nutrients*, 12(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu12061756>
- Bzikowska-Jura, A., Czerwonogrodzka-Senczyna, A., Olędzka, G., Szostak-Węgierek, D., Weker, H., & Wesołowska, A. (2018). Maternal nutrition and body composition during breastfeeding: Association with human milk composition. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu10101379>
- Cacho, N. T., & Lawrence, R. M. (2017). Innate immunity and breast milk. In *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00584>
- Calil, V. M., Tuma, L., & Falcão, M. C. (2003). Composição do leite humano: o alimento ideal. *Revista de Medicina*, 82(1–4), 1–10. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v82i1-4p1-10>
- Cascone, D., Tomassoni, D., Napolitano, F., & Di Giuseppe, G. (2019). Evaluation of

- knowledge, attitudes, and practices about exclusive breastfeeding among women in Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph16122118>
- Czosnykowska-Łukacka, M., Orczyk-Pawłowicz, M., Broers, B., & Królak-Olejek, B. (2019). Lactoferrin in human milk of prolonged lactation. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu11102350>
- França, B. K., Melo Alves, M. R., Silveira Souto, F. M., Tiziane, L., Freire Boaventura, R., Guimarães, A., & Alves, A. (2013). Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *GE Jornal Português de Gastrenterologia*. <https://doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>
- Gila-Díaz, A., Carrillo, G. H., Cañas, S., Pipaón, M. S. de, Martínez-Orgado, J. A., Rodríguez-Rodríguez, P., de Pablo, Á. L. L., Martín-Cabrejas, M. A., Ramiro-Cortijo, D., & Arribas, S. M. (2020). Influence of maternal age and gestational age on breast milk antioxidants during the first month of lactation. *Nutrients*, 12(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu12092569>
- Gomes, M. M., Saunders, C., & Accioly, E. (2005). Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. <https://doi.org/10.1590/s1519-38292005000300003>
- Hanna, N. (2004). Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 89(6), F518–F520. <https://doi.org/10.1136/adf.2004.049247>
- Howland, V., Klaedtke, M., Ruhnau, J., Dhople, V. M., Grabe, H. J., Völker, U., Heckmann, M., & Hammer, E. (2020). Impact of storage conditions on the breast milk peptidome. *Nutrients*, 12(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu12092733>
- Huang, H. L., Chuang, L. T., Li, H. H., Lin, C. P., & Glew, R. H. (2013). Docosahexaenoic acid in maternal and neonatal plasma phospholipids and milk lipids of Taiwanese women in Kinmen: Fatty acid composition of maternal blood, neonatal blood and breast milk. *Lipids in Health and Disease*. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-27>
- Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K., & Jouyban, A. (2015). Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders.

- BiolImpacts*, 5(3), 123–127. <https://doi.org/10.15171/bi.2015.20>
- Kim, S. Y., & Yi, D. Y. (2020). Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clinical and Experimental Pediatrics*. <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00059>
- Koletzko, B. (2017). Human milk lipids. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 69(2), 28–40. <https://doi.org/10.1159/000452819>
- Konak, M., Minici, M., Tarakçı, N., Altunhan, H., Toker, A., & Örs, R. (2019). Effects of the storage of breast milk at different temperatures on total antioxidant capacity, total oxidant status, and paraoxonase-1 level. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 61(1), 1. <https://doi.org/10.24953/turkjped.2019.01.001>
- Krol, K. M., & Grossmann, T. (2018). Psychological effects of breastfeeding on children and mothers. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 61(8), 977–985. <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2769-0>
- Lönnerdal, B., Erdmann, P., Thakkar, S. K., Sauser, J., & Destailats, F. (2017). Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 41, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.06.001>
- Markievicz Mancio KUS, M., AUED-PIMENTEL, S., & MANCINI-FILHO, J. (2011). Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais. *Brazilian Journal of Food Technology*. <https://doi.org/10.4260/bjft2011140200019>
- Mosca, F., & Giannì, M. L. (2017). Human milk: composition and health benefits. In *La Pediatria medica e chirurgica: Medical and surgical pediatrics*. <https://doi.org/10.4081/pmc.2017.155>
- Nogueira, J. A. V., Santos, M. M. de O., Passos, M. C., Cunha, L. R. da, Parreiras, P. M., & Menezes, C. C. (2018). Stability of Antioxidant Capacity of Human Milk after Freezing and Pasteurization. *Journal of Food and Nutrition Research*, 6(7), 450–455. <https://doi.org/10.12691/jfnr-6-7-5>
- Nunes, L. M. (2015). Importância do aleitamento materno na atualidade. *Boletim Científico de Pediatria*.

- Ongprasert, K., Ruangsuriya, J., Malasao, R., Sapbamrer, R., Suppansan, P., Ayood, P., Kittisakmontri, K., & Siviroj, P. (2020). Macronutrient, immunoglobulin a and total antioxidant capacity profiles of human milk from 1 to 24 months: a cross-sectional study in Thailand. *International Breastfeeding Journal*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13006-020-00333-5>
- Órfão, A., & Gouveia, C. (2009). Apontamentos de anatomia e fisiologia da lactação. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, 25(3), 356–362. <https://doi.org/10.32385/rpmgf.v25i3.10631>
- Păduraru, L., Dimitriu, D. C., Avasiloeaiei, A. L., Moscalu, M., Zonda, G. I., & Stamatin, M. (2018). Total antioxidant status in fresh and stored human milk from mothers of term and preterm neonates. *Pediatrics and Neonatology*, 59(6), 600–605. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2018.02.004>
- Plaza-Díaz, J., Fontana, L., & Gil, A. (2018). Human milk oligosaccharides and immune system development. *Nutrients*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/nu10081038>
- Pozzo, L., Cirrincione, S., Russo, R., Karamać, M., Amarowicz, R., Coscia, A., Antoniazzi, S., Cavallarin, L., & Giribaldi, M. (2019). Comparison of oxidative status of human milk, human milk fortifiers and preterm infant formulas. *Foods*, 8(10), 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods8100458>
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>
- Queiroz, V. A. de O., Assis, A. M. O., & da Costa, H. R. (2013). Efeito protetor da lactoferrina humana no trato gastrointestinal. In *Revista Paulista de Pediatria*. <https://doi.org/10.1590/S0103-05822013000100015>
- Raoof, N. A., Adamkin, D. H., Radmacher, P. G., & Telang, S. (2016). Comparison of lactoferrin activity in fresh and stored human milk. *Journal of Perinatology*, 36(3), 207–209. <https://doi.org/10.1038/jp.2015.186>
- Rice-Evans, C., & Miller, N. J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234(C), 279–293. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34095-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34095-1)

- SanGiovanni, J. P., & Chew, E. Y. (2005). The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. In *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.06.002>
- Silvestre, D., Miranda, M., Muriach, M., Almansa, I., Jareño, E., & Romero, F. J. (2010). Frozen Breast Milk at -20°C and -80°C: A Longitudinal Study of Glutathione Peroxidase Activity and Malondialdehyde Concentration. *Journal of Human Lactation*, 26(1), 35–41. <https://doi.org/10.1177/0890334409342987>
- Thai, J. D., & Gregory, K. E. (2020). Bioactive factors in human breast milk attenuate intestinal inflammation during early life. *Nutrients*, 12(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu12020581>
- Tijerina-Sáenz, A., Innis, S. M., & Kitts, D. D. (2009). Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and e and fatty acid composition. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01437.x>
- Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. D. F., Manfredini, V., Benfato, M. D. S., & Kubota, L. T. (2007). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quimica Nova*, 30(5), 1323–1338. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422007000500046>
- Villavicencio, A., Rueda, M. S., Turin, C. G., & Ochoa, T. J. (2017). Factors affecting lactoferrin concentration in human milk: How much do we know? *Biochemistry and Cell Biology*, 95(1), 12–21. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0060>
- Wesolowska, A., Brys, J., Barbarska, O., Strom, K., Szymanska-Majchrzak, J., Karzel, K., Pawlikowska, E., Zielinska, M. A., Hamulka, J., & Oledzka, G. (2019). Lipid profile, lipase bioactivity, and lipophilic antioxidant content in high pressure processed donor human milk. *Nutrients*, 11(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu11091972>
- Wu, K., Zhu, J., Zhou, L., Shen, L., Mao, Y., Zhao, Y., Gao, R., Lou, Z., Cai, M., & Wang, B. (2020). Lactational changes of fatty acids and fat-soluble antioxidants in human milk from healthy Chinese mothers. *British Journal of Nutrition*, 123(8), 841–848. <https://doi.org/10.1017/S0007114520000239>

Yundelfa, M., Mayetti, M., & Lipoeto, N. I. (2018). Effect of Duration and Temperatur Breastmilk Storage and The way of Diluting Breastmilk on Protein and Fat Levels in Breastmilk. *Journal of Midwifery*, 3(1), 72. <https://doi.org/10.25077/jom.1.1.72-83.2018>

ANEXOS

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

“AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PERFIL ANTIOXIDANTE E PRÓ-OXIDANTE NO LEITE MATERNO FRESCO E APÓS O CONGELAMENTO”

Responsável pela pesquisa: Prof. Dr. Márcio Fronza.

“Universidade Vila Velha”

Este documento que você está lendo é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ele contém explicações sobre o estudo que você está sendo convidada a participar (Nome do estudo) Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida participar, você será solicitado a assiná-lo e receberá uma cópia do mesmo. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo). Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Essa pesquisa procura avaliar as modificações no perfil oxidante/antioxidante do leite humano com o armazenamento. Caso decida aceitar o convite, você será submetida aos seguintes procedimentos: responder questionários pré-elaborados; fornecer 10 ml de leite humano, coletado manualmente na sua residência.

Os riscos envolvidos com sua participação são: leve desconforto durante a coleta do leite, constrangimento ao responder aos questionários que serão minimizados através das seguintes providências: coleta de leite feita com técnica adequada por profissional treinado, a entrevista sigilosa e individual sem identificação posterior de quem responde o questionário. Caso esse procedimento possa gerar algum tipo de constrangimento você não precisa realizá-lo.

Você terá os seguintes benefícios ao participar da pesquisa: ter apoio para amamentar e aprenderá técnicas para coleta e armazenamento do leite humano. Sua participação poderá ajudar no maior conhecimento sobre o tempo de armazenamento do leite após coleta e congelamento.

Todas as informações obtidas serão sigilosas. O material com as suas informações (questionário) ficará guardado em local seguro sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Marcio Fronza com a garantia de manutenção do sigilo e confidencialidade e que será destruído após a pesquisa. A divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Conforme previsto pelas normas brasileiras de pesquisa com a participação de seres humanos você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo. Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido pelo pesquisador principal, Marcio Fronza que poderá ser acionada pelo e-mail, caso solicite.

Conforme previsto pelas normas brasileiras de pesquisa com a participação de seres humanos você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo. Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

Você ficará com uma via deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para o Prof. Dr. Marcio Fronza, Rua Comissário José Dantas de Melo, nº 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP: 29.102-770, Tel.: (27) 3421-2087.

Dúvidas sobre a pesquisa envolvendo princípios éticos poderão ser questionadas ao **Comitê de Ética em Pesquisa da UVV** localizado Prédio da Reitoria no subsolo: na Rua Comissário José Dantas de Melo, nº 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP: 29.102-770, Tel.: (27) 3421-2063, E-mail: cep@uvv.br. Horário de funcionamento: 2ª a 5ª 07h às 12h e das 13h às 17h e 6ª feira - 07h às 12h e das 13h às 16h. Secretária: Sirlene Gomes Neves. Reclamações e/ou insatisfações relacionadas à participação do paciente na pesquisa poderão ser comunicadas por escrito à Secretaria do CEP/UVV, desde que os reclamantes se identifiquem, sendo que o seu nome será mantido em anonimato.

Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que fui devidamente informada e esclarecida pelo pesquisador sobre a pesquisa “Avaliação da estabilidade dos perfis antioxidante, pró-oxidante e teor de proteínas no leite materno fresco e após o congelamento”, dos procedimentos nela envolvidos, assim como dos possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso me traga prejuízo ou penalidade. Caso haja algum gasto que seja devido à minha participação na pesquisa, eu serei ressarcido pelo pesquisador principal, Marcio Fronza que poderá ser acionada pelo e-mail marcio.fronza@uvv.br, se eu solicitar. Em qualquer momento, se eu sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, eu terei direito a indenização por meio das vias judiciais e/ou extrajudiciais conforme o Código Civil e Resolução CNS nº 510 de 2016, Artigo 19.

Participante (Paciente ou Responsável): (assinatura, nome e CPF)

Pesquisador responsável: (assinatura, nome e CPF)

Pesquisador Participante (assinatura, nome e CPF)

ANEXO B – Questionário de anamnese e sociodemográfico**QUESTIONÁRIO**

Data: _____

Nome: _____

Idade: _____ Endereço: _____

Tel.: _____

1. Até que série você estudou?

- ☐ Sem escolaridade
- ☐ Ensino fundamental incompleto
- ☐ Ensino fundamental completo
- ☐ Ensino médio
- ☐ Ensino superior incompleto
- ☐ Ensino superior completo
- ☐ Pós-graduação

2. Qual é a renda mensal na sua família?

- ☐ Sem renda
- ☐ Menos que 1 salário mínimo
- ☐ 1 salário mínimo
- ☐ Entre 1 e 2 salários mínimos
- ☐ Entre 2 e 3 salários mínimos
- ☐ Entre 3 e 5 salários mínimos
- ☐ Acima de 5 salários mínimos

3. Você trabalha?

- ☐ Sim, profissão: _____
- ☐ Não

4. Qual a idade atual do bebê? _____

5. Seu bebê nasceu com quantas semanas? _____

6. Qual foi o tipo de parto?

- ☐ Normal
- ☐ Cesárea

7. Você fez acompanhamento pré-natal?

- ☐ Sim
- ☐ Não

8. Quantos filhos você tem?

- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ 3 ou mais

9. Você recebeu orientações quanto ao aleitamento materno nessa última gestação?
- ☐ Sim
 - ☐ Não
10. Se sim, qual o tipo de orientação?
- ☐ Vantagens do aleitamento materno
 - ☐ Posição do bebê e da mãe
 - ☐ Preparação das mamas
 - ☐ Horário de oferta
 - ☐ Armazenamento do leite
 - ☐ Pega correta
 - ☐ Até quando amamentar
 - ☐ Outras: _____
11. Você conhece alguma vantagem do aleitamento materno? Qual?
- _____
- _____
12. Qual é a sua idade?
- ☐ Entre 20 e 25 anos
 - ☐ Entre 26 e 30 anos
 - ☐ menos de 20 anos
 - ☐ mais de 30 anos
13. Você tem apoio da sua família para continuar amamentando seu filho?
- ☐ sim
 - ☐ não
14. Como você realiza a preparação das mamas?
- ☐ Lava apenas com água
 - ☐ Realiza massagens
 - ☐ Lava com água e sabão
 - ☐ Realiza atrito
 - ☐ Passa creme
 - ☐ Nada
15. De quanto em quanto tempo você amamenta seu filho?
- ☐ 1 em 1 hora
 - ☐ 3 em 3 horas
 - ☐ Na hora que ele quer
 - ☐ 2 em 2 horas
 - ☐ 4 em 4 horas
16. Você já guardou o leite para oferecê-lo em outro momento a seu filho?
- ☐ Sim. Como? _____
 - ☐ Não.
17. Até qual idade você considera importante oferecer apenas o seu leite?
- ☐ 2 meses
 - ☐ 4 meses
 - ☐ 6 meses
 - ☐ 3 meses

- ☐ 6 meses
- ☐ 2 anos ou mais

18. Você recebeu orientações sobre a introdução de novos alimentos e a idade ideal para acontecer?

- ☐ Sim. Idade: _____
- ☐ Não

19. Você recebeu orientações quanto ao uso de algum utensílio abaixo?

- ☐ Mamadeira
- ☐ Seringa
- ☐ Colher
- ☐ Copo
- ☐ Xícara

20. O que você usa para alimentar de seu filho?

- ☐ Mamadeira. Desde ____ meses.
- ☐ Copo. Desde ____ meses.
- ☐ Seringa. Desde ____ meses.
- ☐ Xícara. Desde ____ meses.
- ☐ Colher. Desde ____ meses.
- ☐ Outros: _____. Desde ____ meses.
- ☐ Apenas o seio.

21. Você conhece as vantagens da utilização do copinho como substituição ao seio materno?

- ☐ Sim
- ☐ Não

22. Você recebeu informações sobre a desvantagem do uso de mamadeira?

- ☐ Sim
- ☐ Não

23. Você oferece chupeta para seu filho?

- ☐ sim
- ☐ não

24. Você oferece algum substituto do leite materno ao seu filho?

- ☐ Fórmula infantil. Desde ____ meses.
- ☐ Leite de vaca. Desde ____ meses.
- ☐ Leite de vaca com maisena. . Desde ____ meses
- ☐ Leite de vaca com água. Desde ____ meses.

25. O que você já ofereceu ao seu filho?

- ☐ Água
- ☐ Alimentos peneirados
- ☐ Suco de frutas
- ☐ Mingau
- ☐ Frutas raspadas
- ☐ Alimentos batidos
- ☐ Sopinha
- ☐ Outro _____

26. Desde quando oferece esses outros alimentos?

- ☐ 2 meses
- ☐ 4 meses
- ☐ 6 meses
- ☐ 3 meses
- ☐ 5 meses
- ☐ Acima de 6 meses

27. Você teve alguma dificuldade no período de amamentação?
Qual? _____

28. Você procurou ajuda de alguém? Quem? _____

29. A senhora costuma consumir leite e seus derivados?

- ☐ sim
- ☐ não

30. A senhora costuma consumir cereal matinal, aveia ou granola?

- ☐ sim
- ☐ não

31. A senhora costuma consumir café?

- ☐ sim
- ☐ não

32. A senhora costuma consumir óleo vegetal ou azeite?

- ☐ sim
- ☐ não

33. A senhora costuma consumir legumes?

- ☐ sim
- ☐ não

34. A senhora costuma consumir ovos (cozido, frito, omelete ou mexido)?

- ☐ sim
- ☐ não

35. A senhora costuma consumir doces?

- ☐ sim
- ☐ não

36. A senhora costuma consumir hambúrguer na refeição?

- ☐ sim
- ☐ não

37. A senhora costuma consumir refrigerante?

- ☐ sim
- ☐ não

38. A senhora costuma consumir frutas?

- ☐ sim
- ☐ não

39. A senhora costuma consumir castanhas, amendoim, nozes?

- ☐ sim
- ☐ não

40. A senhora costuma consumir salgados fritos, como pastéis, coxinhas, risóis e bolinhos?

- ☐ sim
- ☐ não

ANEXO C – Parecer de aprovação do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PERFIL ANTIOXIDANTE E PRÓ-OXIDANTE NO LEITE MATERNO FRESCO E APÓS O CONGELAMENTO

Pesquisador: Marcio Fronza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 36831020.0.0000.5064

Instituição Proponente: SOC EDUC DO ESP SANTO UNIDADE DE V VELHA ENSINO SUPERIO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.282.003

Apresentação do Projeto:

O leite materno é uma importante fonte de nutrição para o lactente, pois é composto por proteínas, gorduras e carboidratos, sendo o alimento essencial para a saúde e crescimento do bebê e proteção contra inúmeras doenças. A defesa antioxidante do corpo é assegurada por fatores endógenos e exógenos. O leite humano contém muitos componentes antioxidantes, como superóxido dismutase, glutathionaperoxidase (GPx), catalase, vitaminas A, C e Ee-caroteno, lisozima, glutathionaperoxidase, SOD, catalase, ceruloplasmina, coenzima Q10, tioredoxina, leptina, adiponectina e oligoelementos- ferro, cobre, zinco e selênio. Esses antioxidantes agem reagindo diretamente com um radical livre antes que ocorram danos ou interferindo na oxidação em andamento na fase líquida ou nas membranas celulares. Desta forma a amamentação é importante para amortecer o estresse oxidativo durante o período neonatal(CACHO; LAWRENCE, 2017).O objetivo deste estudo é avaliar a estabilidade do perfil antioxidante e pró-oxidante no leite materno fresco e após diferentes tempos e temperaturas de armazenamento. As amostras de leite materno serão fornecidas pelo Banco de Leite Humano do Hospital Infantil e Maternidade Dr. Alzir Bernardino Alves (HIMABA) localizado no município de Vila

Endereço: Avenida Comissário José Dantas de Melo, 21
Bairro: BOA VISTA II **CEP:** 29.102-920
UF: ES **Município:** VILA VELHA
Telefone: (27)3421-2063 **Fax:** (27)3421-2063 **E-mail:** CEP@uvv.br



UNIVERSIDADE
VILA VELHA

UNIVERSIDADE VILA VELHA -
ES/UVV



Continuação do Parecer: 4.282.003

Velha-ES. A atividade antioxidante do leite materno será determinada nas amostras de leite pelos métodos do sequestro do radical livre ABTS, DPPH e pelo método da redução do Ferro (FRAP). A determinação da atividade enzimática da glutathione peroxidase será realizada pelo teste de enzaimunoensaio (ELISA). As concentrações das vitaminas A e E serão realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência. O estresse oxidativo será avaliado pelo nível de peroxidação lipídica, por meio da dosagem de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela dosagem dos produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP). Nossa hipótese é que o tempo de congelamento afetará a composição do leite o que levará a diminuição ou perda da qualidade do leite.

Hipótese:

Muito se tem pesquisado sobre leite materno, o efeito do armazenamento, fatores relacionados aos efeitos bacteriológicos, nutricionais e imunológicos, porém sobre os efeitos do congelamento e capacidade antioxidante a maioria dos artigos ressaltam a importância de pesquisar mais sobre o assunto por ser pouco explorado e ter muitos estudos inconclusivos. Neste contexto, nossa proposta é avaliar o efeito do congelamento sobre a capacidade antioxidante e o perfil pro oxidante do leite materno, garantindo que os lactentes recebam leite materno de qualidade. Nossa hipótese é que o tempo de congelamento afetaria a composição do leite o que levaria a diminuição ou perda da qualidade.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a estabilidade do perfil antioxidante e pró-oxidante no leite materno fresco e após diferentes tempos e temperaturas de armazenamento.

Objetivo Secundário:

- o Avaliar o perfil antioxidante pelos ensaios do ABTS, DPPH e FRAP no leite materno;
- o Determinar a atividade da enzima glutathione peroxidase;
- o Quantificar as vitaminas A e E no leite materno;
- o Avaliar o nível de peroxidação lipídica, por meio da dosagem de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) no leite materno;
- o Quantificar os produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) no leite materno;

Endereço: Avenida Comissário José Dantas de Melo, 21

Bairro: BOA VISTA II

CEP: 29.102-920

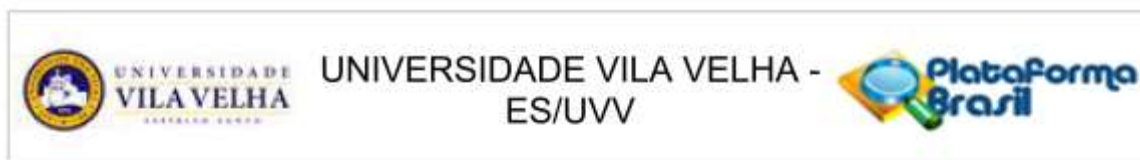
UF: ES

Município: VILA VELHA

Telefone: (27)3421-2063

Fax: (27)3421-2063

E-mail: CEP@uvv.br



Continuação do Parecer: 4.282.003

o Avaliar o padrão alimentar das doadores do leite.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos envolvidos com sua participação são: leve desconforto durante a coleta do leite, constrangimento ao responder aos questionários que serão minimizados através das seguintes providências: coleta de leite feita com técnica adequada por profissional treinado, a entrevista sigilosa e individual sem identificação posterior de quem responde o questionário.

Benefícios:

Benefícios ao participar da pesquisa: ter apoio para amamentar e aprenderá técnicas para coleta e armazenamento do leite humano. Sua participação poderá ajudar no maior conhecimento sobre o tempo de armazenamento do leite após coleta e congelamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e bem fundamentada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado acata o parecer do relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1615348.pdf	19/08/2020 11:50:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	brochurapesquisa.pdf	19/08/2020 11:49:39	Marcio Fronza	Aceito
Outros	parecerhimaba.pdf	19/08/2020 11:48:15	Marcio Fronza	Aceito

Endereço: Avenida Comissário José Dantas de Melo, 21

Bairro: BOA VISTA II

CEP: 29.102-920

UF: ES

Município: VILA VELHA

Telefone: (27)3421-2063

Fax: (27)3421-2063

E-mail: CEP@uvv.br



UNIVERSIDADE
VILA VELHA
ESTADUAL

UNIVERSIDADE VILA VELHA -
ES/UVV



Continuação do Parecer: 4.282.003

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	19/08/2020 11:47:09	Marcio Fronza	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_ass.pdf	19/08/2020 10:16:09	Marcio Fronza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VILA VELHA, 16 de Setembro de 2020

Assinado por:
Valéria Rosseto Lemos
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Comissário José Dantas de Melo, 21

Bairro: BOA VISTA II

CEP: 29.102-920

UF: ES

Município: VILA VELHA

Telefone: (27)3421-2063

Fax: (27)3421-2063

E-mail: CEP@uvv.br

ANEXO D: Comprovante de submissão e *status* do processo de revisão do manuscrito

ScholarOne Manuscripts™

Marcelo Frenza ▾ Instructions & Forms Help Log Out

Journal of Human Lactation

SAGE track

Home Author

Author Dashboard

Author Dashboard

- 1 Submitted Manuscripts >
- Start New Submission >
- 5 Most Recent E-mails >

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM: Kornegay, Mary Kate	JHL-21-11-328	The time and temperature of breast milk storage influences the antioxidant properties and malondialdehyde concentration	17-Nov-2021	03-Dec-2021
In Review		View Submission		

[Contact Journal](#)