



IPL

escola superior de turismo
e tecnologia do mar
instituto politécnico de leiria

Estabilidade físico-química de fórmulas infantis

Cláudia Sofia Carneiro Tavares

[2013]



IPL

**escola superior de turismo
e tecnologia do mar**
instituto politécnico de leiria

Estabilidade físico-química de fórmulas infantis

Cláudia Sofia Carneiro Tavares

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Gestão de Qualidade e Segurança Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Carla Sofia Ramos Tecelão

[2013]

Título: Estabilidade físico-química de fórmulas infantis

Copyright © Cláudia Sofia Carneiro Tavares

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2013

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas, às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular.

À Professora Doutora Carla Tecelão, pelo apoio e sabedoria demonstrado ao longo destes meses difíceis.

Ao Técnico Pedro Ramalho pela paciência, dedicação e pela ajuda preciosa dada quando o pânico se instaurava no laboratório e o medo falava mais alto, sem ele talvez muito trabalho desta tese não tivesse sido concluído.

Ao Tiago Simões pela ajuda com a Cromatografia gasosa.

À Professora Maria Sofia Lopes pela ajuda no tratamento estatístico.

À minha família por nunca me deixar desistir, em especial a minha avó Fernanda que sempre me deu forças e me encorajou a continuar.

Aos meus colegas de Mestrado, que de uma maneira ou de outra tornaram os dias de laboratório mais entusiasmantes.

Aos meus amigos que me motivaram a acabar a tese.

À Marta ao Ruben e a Sara que ao longo de 7 longos meses me ouviram e me deram força.

"A experiência humana não seria tão rica e gratificante se não existissem obstáculos a superar. O cume ensolarado de uma montanha não seria tão maravilhoso se não existissem vales sombrios a atravessar"

Hellen Keller

RESUMO

O aleitamento materno é reconhecido como a forma ideal de alimentação do recém-nascido, proporcionando vários benefícios para a sua saúde. Assim, a amamentação deve ser promovida ativamente, protegida e apoiada. Os bebês que não podem ser alimentados com leite humano têm como opção a alimentação artificial através de fórmulas lácteas. As fórmulas para lactentes são géneros alimentícios com indicações nutricionais específicas, destinados a lactentes durante os primeiros meses de vida, que satisfaçam as suas necessidades nutricionais até à introdução de alimentação complementar adequada.

A indústria alimentar tem-se esforçado na melhoria da qualidade nutricional de fórmulas infantis, numa tentativa de as assemelhar à composição do leite humano.

No presente trabalho pretendeu avaliar-se a estabilidade físico-química de quatro fórmulas para recém-nascidos, três para prematuro (designadas FPT1, FPT2 e FPT3) e uma para recém-nascido a termo para fins medicinais específicos (denominada FME), ao longo de 4 semanas (tempo de vida útil do produto após abertura da embalagem). Para o efeito, analisou-se o teor de humidade, cinza, acidez, teor de azoto, gordura total e perfil em ácidos gordos por cromatografia gasosa. Os teores de azoto e de cinza foram determinados na semana de abertura da embalagem e na 4ª semana após abertura enquanto o teor de humidade, a acidez e a gordura total foram quantificados semanalmente ao longo de 1 mês.

Verificou-se um aumento do teor de humidade ao longo do tempo de armazenamento, obtendo-se os valores mais elevados para as fórmulas FME e FPT3 ($3,14 \pm 0,18$ e $3,54 \pm 0,49$, respetivamente) As fórmulas FME e FPT2 apresentaram o teor de acidez mais elevado ($8,97\% \pm 1,01$ e $8,53\% \pm 0,58$, respetivamente) conjuntamente com a fórmula FPT1 ($4,99\% \pm 0,01$). Relativamente ao teor de proteína, as fórmulas para prematuro apresentaram os valores mais elevados, não se observando alterações significativas ao longo do tempo de armazenamento. A matéria gorda apresentou alguma inconsistência ao longo do tempo, sendo FPT1 a fórmula com menor teor de gordura inicial. A cinza total sofreu uma diminuição acentuada ao longo de 4 semanas, verificando-se a maior perda de matéria mineral nas fórmulas FPT1 e FPT3 (1,02%).

As análises por cromatografia gasosa indicaram que o ácido oleico é o ácido gordo maioritário nas fórmulas analisadas.

Palavras-chave: fórmulas infantis, qualidade nutricional, ácidos gordos, armazenamento.

ABSTRACT

Breastfeeding is recognized as the ideal way of feeding the newborn, providing many benefits to his own health. Therefore, breast-feeding should be actively promoted, protected and supported. Babies that can't be fed by human milk have the option of artificial feeding through milk formulas. Infant formulas are food with specific nutritional indications for infants during the first months of life that satisfy their nutritional needs until the introduction of appropriate complementary nourishment.

The food industry has continually dedicated to improve the quality and nutritional content of infant formula in an attempt to resemble the composition of human milk.

The present work aimed to evaluate the physical and chemical stability of four formulas for new born, three for premature (designated FPT1, FPT2 and FPT3) and one for term new born to special medical purposes (called FME), along 4 weeks (shelf life of the product after opening the packing). To this end, the moisture, ash content, acidity, nitrogen content, total fat and fatty acid profile by gas chromatography were assessed. The nitrogen and ash contents were determined in the opening week of the packing and in the 4th week after opening while the moisture content, acidity and total fat were measured weekly over 1 month.

There was an increase in moisture content over the storage period, resulting in higher values for the FME and FPT3 ($3,14 \pm 0,18$ and $3,54 \pm 0,49$, respectively). FPT2 and FME showed the highest level of acidity ($8,97\% \pm 1,01$ and $8,53\% \pm 0,58$, respectively), together with formula FPT1 ($4,99\% \pm 0,01$). Regarding protein content, the formulas for preterm showed the highest values and there were no significant changes over storage time. The fat showed some inconsistencies over time, being FPT1 the formula with the lowest initial fat content. The total ash suffered a sharp decline over 4 weeks, checking the greatest loss of mineral matter in the formulas FPT1 and FPT3 (1.02%).

Analysis by gas chromatography indicated that oleic acid is the major fatty acid in the formulas analyzed.

Keywords: infant formulas, nutritional quality, fatty acid, storage

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
INDICE GERAL.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	xi
INDICE DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	xviii
1. REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 O Aleitamento Materno	1
1.1.1 Composição do leite humano.....	2
1.1.2 Fatores que afetam a produção e a composição do leite materno	5
1.2 Fórmulas Infantis.....	7
1.2.1 Evolução.....	7
1.2.2 Tipos de Fórmulas.....	7
1.2.3 Composição nutricional.....	9
1.2.4 Estabilidade físico-química de fórmulas infantis.....	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Plano de amostragem.....	17
3.2 Determinação do teor de humidade.....	17
3.3 Determinação do teor de cinza.....	18
3.4 Determinação da acidez.....	19
3.5 Determinação do teor de azoto total.....	19
3.6 Determinação do teor de gordura total.....	21
3.7 Avaliação do perfil em ácidos gordos por cromatografia gasosa.....	22

3.8	Análise Estatística.....	23
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	Quantificação do teor de humidade.....	26
4.2	Quantificação do teor de cinza.....	28
4.3	Quantificação do teor de acidez.....	29
4.4	Determinação do teor de azoto total.....	32
4.5	Quantificação do teor de gordura.....	34
4.6	Avaliação do perfil em ácidos gordos por cromatografia gasosa.....	36
5.	CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS	43
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Mecanismo de absorção de gordura de leite humano e de leite de fórmula.

Figura 3.1. Cadinhos com amostra de leite em pó.

Figura 4.1. Comparação dos valores médios de teor de humidade, quando comparados os valores das 5 semanas. As colunas representam os valores médios de teor de humidade. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.2. Variação do teor de humidade para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana. As linhas verticais correspondem aos valores do Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.3. Comparação dos valores médios de teor de cinza, quando comparados os valores das semanas inicial e final. As colunas representam os valores médios de teor de cinza. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.4. Variação do teor de cinza para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana. As linhas verticais correspondem aos valores do Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.5. Comparação dos valores médios de teor de acidez, quando comparados os valores das semanas inicial e final. As colunas representam os valores médios de teor de acidez. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.6. Variação do teor de acidez para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana. As linhas verticais correspondem aos valores Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.7. Comparação dos valores médios de teor de proteína, quando comparados os valores das semanas inicial e final. As colunas representam os valores médios de teor de proteína. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.8. Variação do teor de proteína para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana. As linhas verticais correspondem aos valores Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.9. Comparação dos valores médios de teor de gordura, quando comparados os valores das 5 semanas. As colunas representam os valores médios de teor de gordura. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.10. Variação do teor de gordura para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana. As linhas verticais correspondem aos valores Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.11. Comparação dos valores médios de teor de ácidos gordos saturados (SFA), quando comparados os valores das 5 semanas. As colunas representam os valores médios de teor de SFA. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.12. Comparação dos valores médios de teor de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), quando comparados os valores das 5 semanas. As colunas representam os valores médios de teor de MUFA. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.13. Comparação dos valores médios de teor de ácidos gordos polinsaturados (PUFA), quando comparados os valores das 5 semanas. As colunas representam os valores médios de teor de PUFA. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.14. Variação do teor de ácidos gordos saturados (SFA), para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana respetivamente. As linhas verticais correspondem aos valores Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.15. Variação do teor de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana respetivamente. As linhas verticais correspondem aos valores do Desvio-Padrão (DP).

Figura 4.16. Variação do teor de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana respetivamente. As linhas verticais correspondem aos valores do desvio padrão.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Composição nutricional do leite humano maduro.

Tabela 1.2. Valores nutricionais mínimos e máximos estipulados para fórmulas para lactentes quando reconstituídas de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 4.1. Resultados médios obtidos para as diferentes análises realizadas (Humidade, Acidez, Gordura, Proteína e Cinza), onde FME corresponde à fórmula láctea destinada a lactente dos 0-6 meses para fins medicinais específicos e FPT1, FPT2 e FPT3 às fórmulas lácteas destinadas a recém-nascido pré-termo.

Tabela 4.2. Resultados médios obtidos para o teor de ácidos gordos onde FME corresponde à fórmula láctea destinada a lactente dos 0-6 meses para fins medicinais específicos e FPT1, FPT2 e FPT3 às fórmulas lácteas destinadas a recém-nascido pré-termo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA- “Arachidonic Acid”- Ácido Araquidónico

AG- Ácidos Gordos

AGL- Ácidos Gordos Livres

AAL- “alfa-linolenic acid”- Ácido alfa-linolénico

AI- “Linoleic acid”- Ácido Linoleico

DAG- “Diacylglycerols”- Diacilgliceróis

DHA- “ Docosahexaenoic Acid” – Ácido Docosahexaenóico

HMF- “Human Milk Fat”- Gordura de leite Humano

LCFA- “Long Chain Fatty Acids”- Ácidos Gordos de Cadeia Longa

LC-PUFA-“Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids”- Ácidos Gordos Polinsaturados de Cadeia Longa

MAG- “Monoacylglycerols”- Monoacilgliceróis

OMS- Organização Mundial de Saúde

TAG- “Triacylglycerols”- Triacilgliceróis

UNICEF- Fundo das Nações Unidas para a Infância

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Aleitamento materno

O leite materno é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) o alimento ideal nos primeiros meses de vida do recém-nascido. Pela sua composição nutricional, o leite humano é um alimento completo e suficiente para suprimir as necessidades nutricionais do recém-nascido nos primeiros seis meses de vida (Espgan 1982; Uauy et al 2001).

O ato de amamentar está claramente associado a elevados benefícios para o latente. Com efeito, a amamentação diminui a incidência e gravidade da diarreia e doenças gastrointestinais (Dewey, et al 1995; Beaudry et al, 1995), infecções respiratórias (Wright et al, 1989), otite média (Dewey et al 1995; Beaudry et al, 1995; Monobe et al, 2003), meningite bacteriana (Cochi et al,1986; Istre et al, 1985), enterocolite necrosante (Chan-Yeung et al 2000), maloclusão ou desalinhamento dos dentes (Palmer, 1998), doenças alérgicas (Lucas et al, 1999), asma na infância (Palmer, 1998), leucemia infantil (Shu et al, 1999), obesidade infantil (Fisher et al 2000), e Síndrome da Morte Súbita Infantil (SMSI) (McVea et al 2000).

A mãe beneficia também do ato de amamentar, associado a uma redução da incidência de cancro da mama na pré-menopausa e de cancro do colo do útero, à redução do peso gestacional, à prevenção da diabetes mellitus tipo 2, do enfarte do miocárdio e da síndrome metabólica.

Diversos fatores influenciam o início e a duração da amamentação, sendo de salientar fatores socioculturais e profissionais, bem como pessoais (percepção da mãe em relação à sua capacidade de amamentar) e educacionais (nível de escolaridade da mãe). Os profissionais de saúde desempenham também um papel preponderante no aconselhamento às mães sobre os benefícios da amamentação para o recém-nascido. O aleitamento materno

foi perdendo relevância ao longo do século XX, em paralelismo com a emancipação feminina e a crescente participação da mulher no mercado laboral (Weaver 2009).

Estudos epidemiológicos realizados em Portugal, sobre a incidência e prevalência do aleitamento materno, demonstram que 80 % das mães portuguesas iniciam a amamentação, mas quase metade destas desiste nos dois primeiros meses de vida do latente, sendo que apenas 55-64% das mães amamentam até aos três meses, e só 34% até aos seis meses, (Cattaneo et al 2005; Sande et al 2007). A duração da amamentação está assim muito afastada da meta preconizada pela OMS (Cardoso, 2006). Estes estudos sugerem ainda que a evolução do aleitamento materno em Portugal se processou de forma análoga à de outros países europeus.

Na década de 90, a OMS e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) criaram a Iniciativa Hospitais Amigos dos Bebés, de modo a proteger e promover o aleitamento materno, através da formação dos profissionais de saúde de hospitais e maternidades (Caldeira et al 2007; Cattaneo et al 2005).

1.1.1 Composição do leite humano

O leite humano não é um fluido corporal uniforme, mas sim uma secreção da glândula mamária cuja composição pode variar consideravelmente de dia para dia, ao longo do dia, (Shubat et al, 1989) e mesmo durante o período de sucção. (Michaelsen, 1994; Butte et al, 1988).

O colostro é produzido, normalmente, cinco a sete dias após o nascimento do bebé, embora em alguns casos possa ser produzido logo após o nascimento, fornecendo todos os nutrientes essenciais, ao recém-nascido. Devido à presença de β -caroteno, o colostro tem uma consistência pegajosa e amarela, variando o volume de produção de 2 a 20 mL/dia, nos três primeiros dias, podendo atingir 580 mL/dia até ao sexto dia (Lawrence e Lawrence 2007). O colostro possui uma quantidade elevada de proteína (97% na forma de imunoglobulina A, IgA), vitaminas lipossolúveis, lactoferrina, fatores de cresci-

mento, enzimas, anticorpos maternos, células vivas (leucócitos, neutrófilos e macrófagos) e bactérias não patogénicas (*Lactobacillus Bifidus*), que atuam no intestino do recém-nascido para limitar o crescimento de bactérias patogénicas e vírus (DHSS, 1988; Akre, 1989). Em menores concentrações encontram-se presentes a gordura, lactose e vitaminas hidrossolúveis (Manotas, 1994; Aguilar, 2005). O colostro protege não só contra infeções e alergias mas também confere imunidade passiva ao recém-nascido por absorção intestinal da imunoglobulina, além de que contém cerca de 2000-4000 linfócitos/mm³ e concentrações altas de lisozima.

Cerca de sete a catorze dias após o nascimento começa a produção do leite de transição que dura, aproximadamente, 9 dias. Existe um aumento das concentrações de lactose e gordura devido ao aumento de colesterol, fosfolípidos e vitaminas hidrossolúveis, ocorrendo em contrapartida uma diminuição das proteínas, imunoglobulinas e vitaminas lipossolúveis. Observa-se um forte aumento da produção de leite que pode atingir 660 mL/dia (Aguayo, 2001; Reyes, 2011; Lawrence e Lawrence, 2007).

A produção de leite maduro inicia-se, aproximadamente, ao 15º dia após o parto e pode continuar durante mais 15 meses. O seu volume médio de produção é de 750 mL/dia mas pode alcançar 1200 mL/dia em mulheres que tiveram uma gravidez múltipla (Aguayo, 2001).

A composição em nutrientes do leite maduro depende da dieta materna e da duração da lactação. O teor de energia varia entre 650 e 750 Kcal/L, em grande parte como resultado da variação no teor de gordura. O leite humano contém hidratos de carbono (o grupo de nutrientes predominante), lípidos (o segundo maior grupo de nutrientes) e proteínas. O leite tem também na sua composição vitaminas, tais como o retinol, vitaminas D, E, C assim como eicosanoóides e minerais tais como o cálcio, fósforo, magnésio, ferro, zinco e potássio (Samour et al 2010).

Na tabela 1.1 apresenta-se a composição nutricional do leite humano maduro.

Tabela 1.1. Composição nutricional do leite humano maduro (Fonte: Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge).

	Por 100g de parte edível	
Energia	Kcal	66
Água	g	87,5
Proteína	g	1,4
Gordura Total	g	3,4
Hidratos de carbono disponíveis	g	7,5
Mono+dissacáridos	g	7,9
Ácidos Gordos Saturados	g	1,5
Ácidos Gordos Monoinsaturados	g	1,3
Ácidos Gordos Polinsaturados	g	0,4
Ácido Linoleico	g	0,3
Colesterol	mg	16
Vitamina A total (equivalentes de retinol),	µg	68
Caroteno	mg	24
Vitamina D	µg	0,05
<i>α</i>-tocoferol	mg	0,35
Tiamina	mg	0,080
Riboflavina	mg	0,030
Equivalentes de niacina	mg	0,70
Niacina	mg	0,20
Triptofano	mg	0,50
Vitamina B6	mg	0,010
Vitamina B12	µg	0,010
Vitamina C	mg	4,0
Folatos	µg	6,0
Cinza	g	0,20
Sódio (Na)	mg	19
Potássio (K)	mg	69
Cálcio (Ca)	mg	32
Fósforo (P)	mg	19
Magnésio (Mg)	mg	4,0
Ferro (Fe)	mg	0,1
Zinco (Zn)	mg	0,1

No leite humano maduro cerca de 50% das calorias são fornecidas sob a forma de gordura. A fração lipídica representa um conteúdo médio de 4,2g/dL, sendo constituída por 98% de triacilgliceróis (TAG “Triacylglycerols”), fosfolípidos (0,8%) e colesterol (0,5%). Os lípidos (3-5%) ocorrem na forma de glóbulos emulsionados na fase aquosa (87%) do leite.

Os TAG do leite humano possuem uma estrutura peculiar que se caracteriza pela presença de ácidos gordos insaturados (essencialmente ácido oleico, C18:1n-9) nas posições externas (*sn*-1 e *sn*-3) do esqueleto de glicerol e pela presença de ácidos gordos saturados (maioritariamente ácido palmítico, C16:0) na posição interna (*sn*-2) do TAG.

Esta composição em ácidos gordos é influenciada por diversos fatores, nomeadamente pela dieta, duração da gestação, etapa da lactação, sendo que a dieta materna parece ser a variável mais importante na determinação da composição em do leite (Rodriguez et al, 1999; Jensen et al, 1992). Manipulando a dieta é possível alterar o teor de ácidos gordos no leite humano (Jensen, 1999).

O leite humano contém na sua composição ácidos gordos essenciais como o ácido linoleico (AL “Linoleic Acid) (C18:2 n-6) e o ácido α -linolénico (AAL, “alfa-linolenic acid”) (C18:3 n-3) e importantes metabolitos, como o ácido araquidónico (AA, “Arachidonic Acid”) (C20:4 <n-6), o ácido eicosapentaenóico (EPA, “Eicosapentaenoic Acid”) (C20:5 n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, “Docosahexaenoic Acid”) (C22:6 n-3). É necessária uma quantidade equilibrada destes ácidos gordos para o normal desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso (Agostoni et al, 1995; Makrides et al, 1995), bem como para uma produção adequada de eicosanóides (Uauy et al, 2000; Sellmayer et al, 1999; Bjerve et al, 1987).

1.1.2 Fatores que afetam a produção e a composição do leite humano

A produção máxima de leite é alcançada entre o terceiro e o quinto mês de lactação e é influenciada por aspetos psicológicos, fisiológicos, sociológicos e biológicos que estão, frequentemente, inter-relacionados (Ronayne, 1993). Os fatores psicológicos e os distúrbios emocionais causam ansiedade e influenciam a secreção de leite e, em casos extremos, podem interromper a produção glandular (Ronayne, 1993). Como fatores fisiológicos, considera-se que a frequência, a duração e a força de sucção da criança influenciam a quantidade de leite produzido pela glândula mamária (SAP, 2001). O recurso a substitutos do leite materno (fórmulas ou suplementos) pode promover a diminuição da produção de leite. Se isto ocorrer entre os 3 e os 5 meses de vida do recém-nascido, a diminuição da produção de leite é permanente, enquanto se for mais tarde, por volta do sexto mês, o volume de produção pode ser mantido acima de 500 mL /dia, até aos 18 meses (Cohen, et al 1994).

Dentro dos fatores biológicos, a noção de leite insuficiente por parte da mãe é apontado como o fator mais determinante para a interrupção do aleitamento em exclusivo (Thulier e Mercer, 2009). O fornecimento insuficiente de leite pode ter causas primárias ou secundárias. As causas primárias são raras (não mais do que 5% dos casos) e resultam de problemas anatómicos ou hormonais. A maior parte dos casos que são declarados pelas mães são efetivamente falsas hipogalácteas, originadas por problemas na gestão do aleitamento, nomeadamente, uma técnica de pega incorreta.

A obesidade e o tabagismo são outros fatores associados à cessação do aleitamento materno (Thulier e Mercer, 2009).

A dieta materna tem uma influência significativa na produção e/ou composição do leite humano. As mães com uma nutrição insuficiente têm aproximadamente a mesma composição em proteína, hidratos de carbono e gordura do que as mães que têm uma boa nutrição, apenas possuem uma menor produção de leite (Gonzalez, et al 1998). Com o auxílio de uma alimentação suplementar entre as mulheres desnutridas a produção de leite pode sofrer um aumento tal com a duração da amamentação (Gonzalez, et al 1998). Em contraste com as mulheres mal nutridas as mulheres bem nutridas não mostram quaisquer benefícios em possuir uma suplementação proteica ou energética. Alguns nutrientes são refletidos no teor do leite materno dependendo da dieta materna, sendo o caso de várias vitaminas, como por exemplo, a vitamina D, vitamina A, e vitaminas hidrossolúveis, iodo e a composição em ácidos gordos.

Os lactentes cujas mães seguem uma dieta vegetariana estrita correm um elevado risco de sofrerem de anemia megaloblástica e de alterações neurológicas devido à deficiência de vitamina B12 (Roschitz, et al 2005). O Comité recomenda que seja feita uma suplementação de vitamina B12 ao leite materno ou aos lactentes caso as mães adotem uma dieta vegan.

1.2 Fórmulas Infantis

A fórmula infantil é um produto à base de leite de vaca, ou de leite de outros animais, e/ou de outros ingredientes que foram aprovados para serem adequados à alimentação infantil. A segurança nutricional e a adequação da fórmula infantil devem ser cientificamente comprovadas por forma a sustentar o crescimento e desenvolvimento normais da criança.

1.2.1 Evolução

A primeira fórmula infantil comercial foi produzida em 1867, idealizada por Justus von Liebig, um químico alemão. Esta fórmula consistia em farinha de trigo, leite de vaca, farinha de malte e bicarbonato de potássio. O produto foi vendido inicialmente na forma líquida, mas cedo se tornou disponível em pó com a adição de farinha de ervilha e um teor de leite inferior. O sucesso comercial do produto rapidamente deu origem a concorrentes como a de Alimentos Infantis Mellin's. (Palmer, 2009).

Em 1919, a gordura do leite foi substituída por uma mistura de gordura animal e vegetal, como parte do esforço contínuo para simular a composição do leite humano (Palmer, 2009).

No final de 1920, Alfred Bosworth lança a Similac e a Mead Johnson a Sobee. Em 1941, a Milk Dried Nacional foi introduzida no Reino Unido. Em meados da década de 1960 as fórmulas foram enriquecidos com ferro (Palmer, 2009).

1.2.2 Tipos de Fórmulas

Existem vários tipos de fórmulas infantis, entre as quais se destacam as fórmulas para bebés a termo, fórmulas enriquecidas com DHA e AA, fórmulas enriquecidas para prematuros, fórmulas à base de soja, fórmulas sem lactose, hipoalergénicas, anti-refluxo e fórmulas para crianças a partir dos 12 meses.

As fórmulas para recém-nascidos a termo são fórmulas habitualmente recomendadas a recém-nascidos que não são alimentados com leite humano. A fonte de hidratos de carbono é a lactose e contém proteína de leite de vaca. O recém-nascido pré-termo tem necessidades calóricas e proteicas diferentes de um recém-nascido a termo, requerendo teores de cálcio, magnésio e fósforo (minerais transferidos no útero durante o terceiro trimestre) mais elevados. Estes requisitos especiais levaram ao desenvolvimento de fórmulas enriquecidas para prematuros. As fórmulas para prematuros contêm 24 kcal por grama, enquanto as fórmulas enriquecidas contêm apenas 22 kcal por grama. As fórmulas enriquecidas estão disponíveis tanto na forma líquida como em pó. O peso e a idade gestacional são fatores decisivos para a prescrição destas fórmulas.

As fórmulas à base de soja possuem na sua composição hidratos de carbono à base de milho e proteína de soja, tornando-as livres de lactose e proteína de leite de vaca. Muitos pais acreditam que este fator melhora a digestibilidade do leite. De acordo com algumas instituições o uso de fórmulas infantis deve ser limitado a crianças com deficiência em galactosemia ou em lactase. (Bhatia, 2008)

As fórmulas sem lactose são uma alternativa às fórmula de soja para os pais que desejam evitar a lactose. Fórmulas sem lactose são indicadas para crianças com deficiência de galactosemia e lactase.

Apenas uma pequena minoria dos recém-nascidos tem alergia à proteína do leite. Nestes casos, os lactentes produzem anticorpos que reagem contra as moléculas de proteína do leite de vaca. Como a maioria dos recém-nascidos pode ser igualmente sensível à proteína de soja, fórmulas hipoalergénicas e não alergénicas são atualmente as mais utilizadas e recomendadas nestes casos (Bhatia et al, 2008). Fórmulas hipoalergénicas contêm proteínas extensamente hidrolisadas, tornando assim menos propício a estimulação da produção de anticorpos (Agostoni et al, 2007).

O refluxo gastroesofágico é comum em recém-nascidos, podendo ser considerado fisiológico não necessitando de tratamento. No entanto, o refluxo é uma fonte comum de preocupação para os pais assim foram criadas fórmulas anti-refluxo para diminuir episódios diários de regurgitação (Craig et al 2004; Moukarzel et al 2007).

Recentemente, fórmulas para crianças ou fórmulas *follow up* foram desenvolvidas para crianças dos nove aos 24 meses de idade. Estas fórmulas à base de leite contêm ferro, vitamina C, vitamina E, e zinco contendo também DHA e AA e cálcio em maior concentração do que as fórmulas infantis normais

1.2.3 Composição nutricional

A Comissão do Codex Alimentarius reviu em 2007 o quadro regulamentar para as fórmulas infantis, incluindo disposições para a sua composição. As recomendações para a composição essencial das fórmulas especificam tanto os valores mínimos como os máximos para 31 nutrientes, com o objetivo de fornecer produtos seguros e nutricionalmente adequados que atendam às necessidades nutricionais de bebês saudáveis (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Valores nutricionais mínimos e máximos estipulados para fórmulas para lactentes quando reconstituídas de acordo com as instruções do fabricante (Fonte: Decreto lei nº217/2008 e Current trends in the composition of infant milk formulas, European commission, 1999)

		Valores Mínimos por 100 Kcal	Valores Máximos por 100 Kcal
Energia		60 Kcal/ 100 ml	75 Kcal/ 100 ml
Proteína	(g)		
Proteína leite de vaca	(g)	1,8	3
Proteína de soja ou Mistura de Proteínas	(g)	2,25	3
Hidrolisados de Proteína	(g)	1,8	3
Lípidos	(g)	4,4	6,0
Ácido Linoleico (AL)	(mg)	300	1200
Ácido alfa-Linolénico (AAL)	(mg)	50	
Razão AL-AAL		5	15
n-3 LC-PUFA			1% do teor total de lípidos
n-6 LC-PUFA			2% do teor total de lípidos
Ácido Araquidónico			1% do teor total de lípidos
Ácido Eicosapentáenoico (EPA)			(1)
Ácido Docosahexaenoico (DHA)			(2)
Ácido Láurico e Ácido Mirístico			Não deve exceder 20% do teor total de lípidos
Hidratos de carbono	(g)	9	14
Lactose	(g)	4,5	
Sacarose			20% do total de hidratos de carbono(3)
Amido Pré-cozido e ou gelatinizado			2g/ 100ml e 30% do total de hidratos de carbono
Minerais			
Sódio	(mg)	20	60
Potássio	(mg)	60	160
Cloro	(mg)	50	160
Cálcio	(mg)	50	140
Fósforo	(mg)	25	90
Magnésio	(mg)	5	15
Ferro	(mg)	0,5	1,5
Zinco	(mg)	0,5	1,5
Cobre	(mg)	35	100
Iodo	(mg)	10	50
Selénio	(mg)	1	9
Vitaminas			
Vitamina A	(µg ER)	60	180
Vitamina D	(µg)	1	2,5
Tiamina	(µg)	40	300
Riboflavina	(µg)	80	400
Niacina	(µg)	300	1500
Ácido Pantoténico	(µg)	400	2000
Vitamina B	(µg)	35	175
Biotina	(µg)	1,5	7,5
Ácido Fólico	(µg)	10	50
Vitamina B12	(µg)	0,1	0,5
Vitamina C	(µg)	10	30
Vitamina K	(µg)	4	5
Vitamina E	(mg α-TE)		(4)
Nucleótidos			
Total			5
5'- monofosfato de citidina	(mg)		2,5
5'- monofosfato de uridina	(mg)		1,75
5'- monofosfato de adenosina	(mg)		1,5
5'- monofosfato de guanosina	(mg)		0,5
5'- monofosfato de inosina	(mg)		1,0

- (1) O teor de ácido Eicosapentanóico (C 20:5 n-3) não deve ser superior ao teor de ácido docosahexanóico (C 22:6 n-3)
 - (2) O teor de ácido docosahexanóico (C22:3 n-3) não deve ser superior ao de LC-PUFA n-6
 - (3) O teor de sacarose eventualmente adicionado não deve ser superior a 20%
 - (4) 0,5g de ácidos gordos polinsaturados expressos em ácido linoleico corrigido para as ligações duplas mas nunca inferior a 0,5 mg /100 Kcal disponíveis.
- ER- Todos os equivalentes do retinol Trans.
A-ET- Equivalente de d- α -tocoferol.

As fórmulas infantis prontas para consumo devem conter, por 100 mL, um teor calórico entre 60 kcal (250 kJ) e 70 kcal (295 kJ) e devem reportar, a 100 kcal, os níveis mínimos e máximos aplicáveis de nutrientes (Koletzko et al 2005).

Dados disponíveis sugerem que um teor de proteína bruta de 1,8 g/100 kcal em fórmulas para lactentes, embora superior ao valor no leite humano, pode ser útil para o crescimento normal do recém-nascido (LSRO,1988; Scientific Committee on Food, 2003). Recomenda-se que os valores de proteína em fórmulas estejam compreendidos entre 1,8 e 2,0 g/100 kcal, para garantir uma quantidade mínima de azoto e aminoácidos disponíveis para a síntese de proteínas.

O teor de proteína nas fórmulas infantis não deve exceder 3g/100Kcal (Koletzko et al 2005).

O conteúdo de gordura total recomendado é de 4,4 a 6,0 g/100 kcal, equivalente a cerca de 40-54 % do teor de energia, que é semelhante aos valores encontrados no leite humano (Koletzko et al, 2001). A absorção de gordura a partir de fórmulas infantis é menor do que a partir de leite humano (Jarvenpaa, 1983; Alemi et al 1981; Signer et al 1974). Esta diferença tem sido explicada pela presença de lípases no leite humano (Hamosh,1989; Bernback et al 1990) e pela estrutura estéreo-específica única dos TAG do leite humano, que favorecem a sua digestão e absorção.

Tal como referido anteriormente, o ácido palmítico está maioritariamente esterificado na posição *sn-2* do TAG da gordura de leite humano (Jensen, 1989; Breckenridge, 1978). Na gordura de leite de vaca e em óleos vegetais, presentes na composição de fórmulas infantis, este ácido gordo encontra-se predominantemente esterificado nas posições *sn-1* e *sn-3* do TAG (Breckenridge, 1978).

A lipase pancreática 1,3 seletiva hidrolisa, preferencialmente, as posições externas do TAG, libertando o ácido palmítico que se complexa com o cálcio conduzindo à formação de sabões de cálcio insolúveis, como exemplificado na figura 1.1 (Zoppi et al 1972; Fredrikzon et al 1978).

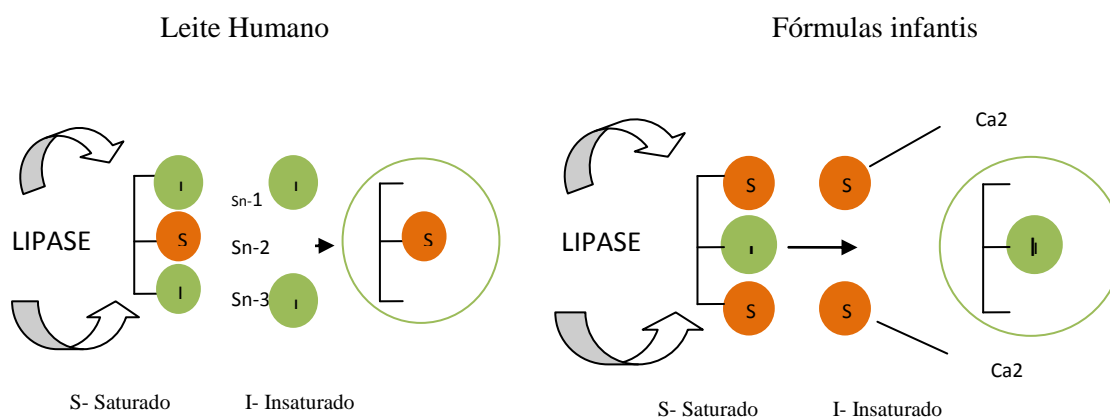


Figura 1.1. Mecanismo de absorção de gordura de leite humano e de leite de fórmula.

A formação de sabões de cálcio no intestino pode explicar as diferenças substanciais nos hábitos intestinais e consistência das fezes de bebés alimentados com leite humano e de bebés alimentados com fórmula (Brueton et al 1978; Murphy, 1974). Com efeito, um lactente alimentado com fórmula sofre, na maioria dos casos, de obstipação intestinal, quer sejam bebés nascidos a termo ou a pré-termo. Em contraste, a prisão de ventre é rara em crianças a termo amamentadas, verificando-se que a regiodistribuição dos ácidos gordos no TAG é importante.

O ácido α -linolénico (AAL, 18:3 n-3) é considerado um ácido gordo indispensável à dieta e atua como um precursor para a síntese de DHA (22:6 n-3), cuja disponibilidade tem sido relacionada com o desenvolvimento neurológico infantil. No entanto, em certas circunstâncias, o consumo elevado de AAL pode aumentar o risco de peroxidação lipídica, rancificação do produto, e pode afetar negativamente a estabilidade da fórmula. O conteúdo de 50 mg/100 kcal (cerca de 0,45% do consumo de energia) é o recomendado. Para assegurar um bom equilíbrio entre os ácidos linoleico (AL, 18:2 n-6) e o AAL, bem como os LC-PUFA e eicosanóides resultantes do seu metabolismo, uma proporção

de AL/AAL de 5-15 é o recomendado. A implementação desta relação também resulta numa limitação do conteúdo de AAL a não mais do que 1/5 de 1200 mg/100 kcal, ou seja, 240 mg/100 kcal. A soma de ácido mirístico (C14:0) e de ácido láurico (C12:0) deve ser inferior a 20% para prevenir potenciais efeitos negativos sobre os níveis de colesterol e de lipoproteína (Koletzko et al, 2005).

A acumulação de LC-PUFA nos tecidos dos bebês começa no último trimestre de gravidez, podendo os recém-nascidos prematuros sofrer de deficiência nestes AG. (Hamosh, 2008). Dado que os órgãos em rápido desenvolvimento, como o cérebro, precisam de LC-PUFA, os recém-nascidos prematuros necessitam de fórmulas que sejam suplementadas de forma a obterem quantidades suficientes destes AG essenciais (Sikorska e Szmura, 2007). Um estudo clínico revelou que crianças alimentadas com fórmulas suplementadas com LC-PUFA possuíam concentrações plasmáticas destes AG semelhantes a bebês que foram amamentados (Schawartz et al 2010).

Os hidratos de carbono são uma fonte essencial de energia para o bebê. O teor total mínimo de hidratos de carbono recomendado é de 9,0 g/100 kcal e baseia-se num cálculo das necessidades de oxidação de glicose (LSRO,1988; Scientific Committee on Food, 2003). O teor máximo de hidratos de carbono é de 14,0 g/100 kcal, sendo equivalente a cerca de 56 % do teor de energia.

1.2.4 Estabilidade físico-química de fórmulas infantis

As fórmulas para lactentes são misturas estáveis de gorduras emulsionantes, proteínas, hidratos de carbono, vitaminas e minerais. A separação de gorduras pode ocorrer durante o tempo em que as latas de leite se encontram abertas e pode dispersar-se por agitação do recipiente. O processo de fabrico de fórmulas infantis contempla diversas etapas que incluem a mistura de componentes, homogeneização, pasteurização e a secagem por pulverização. A aplicação de calor em algumas etapas origina reações entre os constituintes das fórmulas infantis. Uma das reações mais importantes que normalmente ocorre é a reação de Maillard. As fórmulas infantis têm um elevado nível de lisina, que pode

reagir com açúcares redutores existentes. Esta reação pode ter lugar durante o armazenamento, especialmente sob condições adversas de temperatura e atmosfera. Dado que as fórmulas infantis podem ser a única fonte de lisina disponível para as crianças, a reação de Maillard é indesejável nestes produtos. (Erbersdobler and Hupe, 1991) Outras reações que podem ocorrer incluem a desnaturação das proteínas, isomerização e cristalização da lactose, o que diminui acentuadamente a solubilidade do leite em pó.

O tempo de prateleira do leite em pó é geralmente estabelecido para garantir a segurança microbiológica e para manter as características organolépticas aceitáveis (por exemplo, cor, sabor, oxidação lipídica). Embora a atividade microbiológica no leite em pó seja estável e aceitável, muitas alterações físico-químicas, tais como a cristalização da lactose, oxidação lipídica, reações de Maillard e reações enzimáticas, podem ocorrer durante o armazenamento.

Propriedades de modificação físicas e funcionais como por exemplo a fluidez, propriedades de reconstituição, propriedades emulsionantes e propriedades de formação de espuma do pó, podem também ocorrer (Thomas et al 2004). A extensão destas alterações é fortemente dependente das condições de armazenamento (isto é, temperatura, humidade relativa e do tempo de abertura da embalagem). A compreensão destas alterações físico-químicas que ocorrem nas condições de armazenamento é bastante útil para prever o comportamento do pó durante a sua utilização final.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho centra-se no estudo da estabilidade físico-química de quatro fórmulas para lactentes, sendo três destinadas ao consumo por recém-nascido pré-termo (FPT1, FPT2 e FPT3) e uma indicada para fins medicinais específicos (FME), ao longo de 4 semanas (prazo de vida útil do produto após abertura da embalagem).

Para o efeito, avaliou-se o teor de humidade, teor de cinza, proteína total, acidez, gordura total e perfil em ácidos gordos, por cromatografia gasosa, e estabeleceu-se a comparação com os limites máximos/mínimos legalmente exigidos.

3. MATERIAIS E METODOS

3.1 Plano de amostragem

O plano de amostragem consistiu em quatro fórmulas lácteas, três para recém-nascido pré-termo (designadas por FPT1, FPT2 e FPT3) e uma destinada a lactente dos 0-6 meses para fins medicinais específicos (denominada FME).

As quatro fórmulas lácteas apresentavam-se em latas de 400g e foram conservadas a uma temperatura de $18,6\text{ °C} \pm 0,97$ ao longo de 4 semanas, que é o prazo de vida útil do produto após abertura da lata.

As determinações do teor de humidade, acidez e gordura foram realizadas semanalmente ao longo de 1 mês. A proteína e a cinza foram quantificadas na semana de abertura das latas e na quarta semana do mês.

3.2 Determinação do teor de humidade

Determinou-se o teor de humidade num analisador de Humidade (Mettler Toledo HB 43 Halogen, Alemanha).

O equipamento dispõe de uma lâmpada de halogéneo que permite um rápido e uniforme aquecimento da amostra em apenas poucos minutos.

Colocou-se $0,507\text{g} \pm 0,008$ de amostra no prato de alumínio e programou-se a analisador de humidade para a secagem a 105°C até atingir-se peso constante.

O teor de humidade é expresso em grama por 100g de amostra e calculado com base na equação 1:

$$\% \textit{Humidade} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (\text{Eq 1})$$

Sendo m_i a massa inicial da amostra e m_f a massa final da amostra (após secagem).

3.3 Determinação do teor de cinza

A cinza de um alimento é o resíduo inorgânico restante após incineração da matéria orgânica.

O procedimento para a determinação do teor de cinza baseou-se no método (SNBN-IT32_03) do Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge (INSA) com alteração na quantidade de amostra analisada.

Pesaram-se 3g de amostra num cadinho de porcelana que foi previamente calcinado em mufla (Nabertherm) a $550^{\circ}\text{C}\pm 10$ e arrefecido antes da respetiva pesagem.



Figura 3.1. Cadinhos com amostra de leite em pó

Colocou-se o cadinho com a amostra sobre uma placa de aquecimento (Selecta Agimatic), aquecendo-se o produto até à sua inflamação. A amostra foi colocada posteriormente na mufla a $550^{\circ}\text{C}\pm 10$ até à combustão total

A cinza total no leite é calculada pela equação 2.

$$\frac{m_2}{m_1} \times 100 \quad (\text{Eq 2})$$

Sendo m_1 a massa da toma de leite expressa em grama e m_2 a massa de cinza expressa em grama.

3.4 Determinação da acidez

O procedimento baseou-se na NP-1090:1980.

Pesou-se, aproximadamente, 1g de leite para um erlenmeyer esmerilado de 100 mL. Pipetaram-se 10mL de água destilada para o erlenmeyer e colocaram-se 6 gotas de fenolftaleína (Merck). Deixou-se em agitação magnética (Selecta Agimatic) até completa dissolução do leite.

Titulou-se a amostra de leite com uma solução de hidróxido de sódio (Panreac) 0,1N até obtenção de uma fraca coloração rósea, persistindo durante 5s. Registou-se o volume de hidróxido de sódio gasto na titulação.

O teor de acidez é expresso em grama por 100g de amostra e calculado com base na equação 3.

$$Acidez = \frac{10V}{m} \quad (Eq\ 3)$$

Sendo m a massa em grama da toma da amostra e V o volume (mL) da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação.

3.5 Determinação do teor de azoto total

Determinou-se o teor de azoto total pelo método de Kjeldahl (ISO/DIS 8986 N789). Este método quantifica o azoto orgânico total, ou seja, o azoto proteico e não proteico.

Pesou-se cerca de 0,5g de amostra para um tubo de Kjeldahl, devidamente identificado. Adicionou-se uma pastilha de mistura catalisadora cobre-selénio (Scharlau). Seguidamente, adicionaram-se 13mL de ácido sulfúrico 95-98% (Sigma-Aldrich) e homogeneizou-se suavemente. Para a amostra em branco foi somente adicionada uma pastilha catalisadora e 13 mL de ácido sulfúrico. Colocaram-se os tubos na unidade de digestão (200s Digestion

System-Foss) inicialmente a 220°C e trinta minutos depois a 400°C durante 90 minutos até obtenção de uma solução límpida. Terminado o ciclo de digestão, deixaram-se os tubos arrefecer até à temperatura ambiente.

Procedeu-se à destilação da amostra num destilador (2100 Kjeltex System, Destillation Unit-Foss). Para o efeito, adicionaram-se 50 mL de água destilada ao tubo de Kjeldahl e 50 mL de ácido bórico (Panreac) a um erlenmeyer de 250mL. Colocou-se o tubo e o erlenmeyer nos respetivos locais no equipamento e procedeu-se à destilação das amostras.

As amostras e o branco foram titulados com uma solução de ácido clorídrico (Panreac) 0,1M. O ponto de viragem da titulação foi identificado pela mudança de cor da solução de verde para azul acinzentado. Registou-se o volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra e do branco.

O teor de azoto é expresso em grama por 100g de amostra e é calculado pela equação 4:

$$\% \text{ de azoto} = \frac{1,4007 \times (V_i - V_0)}{m} \quad (\text{Eq 4})$$

Sendo v_i o volume (mL) da solução de ácido clorídrico 0,1M gasto na titulação da amostra, v_0 o volume (mL) da solução de ácido clorídrico 0,1M gasto na titulação do branco e m a massa (g) da toma de amostra.

O teor de proteína é expresso em percentagem por massa pela equação 5

$$\% \text{ de proteina} = \% \text{ de azoto} \times 6,38 \quad (\text{Eq 5})$$

3.6 Determinação do teor de gordura total

O método de Rose-Gottlieb foi o utilizado para a extração da gordura no leite em pó. Esta técnica consiste na extração da matéria gorda por um solvente apropriado, evaporação do solvente e pesagem do resíduo.

Pesou-se, aproximadamente, 1g de leite em pó para um erlenmeyer de 250mL. Adicionou-se 1mL de água destilada e 9mL de água destilada ligeiramente aquecida e homogeneizou-se numa placa de agitação magnética (VELPR Científica). Adicionou-se 2mL de hidróxido de amónia a 25% (VWR) e aqueceu-se a amostra em banho-maria (memmert) a 60°C durante 15 minutos, agitando-se para promover a dissolução da caseína. Arrefeceu-se a amostra à temperatura ambiente.

Posteriormente, transferiu-se a amostra para uma ampola de decantação, adicionou-se 10 mL de álcool etílico 96% (v/v) (Merck) e homogeneizou-se. Adicionou-se, 25 mL de éter etílico (Merck e agitou-se durante cerca de 1 minuto. Colocou-se a ampola de decantação na posição vertical no suporte e adicionou-se 25 mL de éter de petróleo (Prolabo) e homogeneizou-se.

Aguardou-se até separação das fases.

Transferiu-se a fase etérea (camada superior) para um balão de fundo redondo de 250 mL previamente seco em estufa (memmert) a 105°C±5°C e pesado depois de arrefecido num exsiccador.

Extraiu-se a camada líquida inferior, mais duas vezes, como anteriormente descrito, e transferiram-se as fases etéreas para o balão de fundo redondo onde já se encontrava a primeira extração.

O solvente foi evaporado num evaporador rotativo de vácuo (Laborota 4000, da Heidolph), em banho a 40°C, até a secura. Seguidamente o balão foi colocado numa estufa a 105°C±5°C até obtenção de peso constante.

A percentagem, de matéria gorda do leite em pó é calculada através da equação 6:

$$\% \text{ de matéria gorda} = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (\text{Eq 6})$$

Sendo m_1 a massa do resíduo em grama e m_2 a massa da toma de leite em grama.

O resíduo de gordura contido no balão após secagem foi dissolvido em éter de petróleo e transferido para um tubo de Falcon. Evaporou-se o solvente num evaporador rotativo e conservou-se a -80°C até posterior utilização.

3.7 Avaliação do perfil em ácidos gordos por cromatografia gasosa

Após descongelação da gordura, pesaram-se 0,05g para um tubo de ensaio de 16mL, adicionou-se 1mL de *n*-hexano (Merck) e 0,2 mL de solução de KOH (Merck) em metanol 2 M. Agitou-se em vortex (Velp Scientifica) durante 3 minutos e deixou-se repousar durante 1 hora.

Posteriormente adicionaram-se 2 gotas de ácido acético glacial (Panreac Quimica S.A) e homogeneizou-se durante 10 segundos. Seguidamente, transferiu-se a fase líquida para um tubo de ensaio contendo 0,5g de sulfato de sódio anidro (Panreac). Agitou-se em vortex durante 2 minutos e centrifugou-se (Eppendorf Centrifuge 5804 R) durante 5 minutos a 23°C e 2500 rpm.

Retirou-se cuidadosamente 150 μL da fase orgânica para um vial (Thermo Scientific) de 2mL e adicionou-se 1350 μL de *n*-hexano.

Os esteres metílicos de AG foram analisados por cromatografia gasosa num Cromatógrafo Finnigan TRACE GC Ultra Gas Chromatograph (*Thermo Electron Corporation*), munido de uma coluna capilar, Thermo TR-FAME (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), de um injetor automático AS 3000 da Thermo Electron Corporation (a operar em modo *splitless*) e de um detetor de ionização de chama. As temperaturas do injetor e do detetor mantiveram-se a 250°C e 260°C , respetivamente. Utilizou-se hélio como gás de arraste, a um caudal de 1,5 mL/min. O ar e o hidrogénio foram fornecidos ao detetor ao caudal de 350 mL/min e 35mL/min, respetivamente.

A temperatura do forno foi programada para 60°C durante 1 minuto, aumentando para 150°C a 15°C/min e permanecendo 1 minuto a essa temperatura. Programou-se um novo aumento até 180°C, a 5°C/min, onde permaneceu 3 minutos e um novo aumento de temperatura até aos 220°C, a 10°C/min e um patamar final nesta temperatura por 1 minuto.

3.8 Análise estatística

Com o objetivo de averiguar a existência de diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo para os parâmetros em análise foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) para medições repetidas com uma correção de Huynh-Feldt ou o teste não paramétrico de Friedman, dependendo da violação ou não dos pressupostos de normalidade dos dados e esfericidade (Maroco 2007).

Para algumas variáveis, foi realizado o teste t-Student para comparação de médias de amostras emparelhadas, depois de verificado o pressuposto de normalidade.

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados através do software IBM SPSS Statistics 21.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância (α) de 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas diferentes análises realizadas encontram-se discriminados na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Resultados médios obtidos para as diferentes análises realizadas (Humidade, Acidez, Gordura, Proteína e Cinza), onde FME corresponde à fórmula láctea destinada a lactente dos 0-6 meses para fins medicinais específicos e FPT1, FPT2 e FPT3 às fórmulas lácteas destinadas a recém-nascido pré-termo.

	Semanas	Humidade (%)	Acidez (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Cinza (%)
FME	0	3,14±0,18	8,97±1,01	22,08±1,63	11,35±1,27	2,27±0,05
	1	3,28±0,13	11,02±0,25	23,12±0,64		
	2	3,35±0,51	11,10±0,28	23,12±1,09		
	3	3,64±0,11	11,11±0,25	23,33±1,46		
	4	3,80±0,30	11,43±0,51	25,22±0,48	14,64±1,22	1,36±0,10
FPT1	0	2,76±0,21	4,99±0,01	21,65±0,86	15,93±1,08	3,46±0,14
	1	2,78±0,21	5,48±0,54	23,48±1,29		
	2	2,90±0,11	5,99±0,008	23,55±0,81		
	3	3,30±0,30	6,66±0,29	23,98±0,46		
	4	3,31±0,55	6,82±0,28	25,45±2,13	17,11±0,54	2,44±0,17
FPT2	0	2,63±0,47	8,53±0,58	26,38±0,39	13,87±0,50	2,96±0,05
	1	2,83±0,22	8,72±0,08	25,36±1,99		
	2	3,03±0,33	8,99±0,009	28,01±0,53		
	3	3,10±0,10	8,97±0,02	27,98±0,16		
	4	3,43±0,10	8,95±0,02	28,64±2,38	15,18±0,64	1,98±0,03
FPT3	0	3,54±0,49	4,65±0,57	25,42±1,16	14,26±1,25	3,27±0,02
	1	3,71±0,11	5,60±0,58	26,32±0,12		
	2	3,84±0,50	5,62±0,29	27,39±0,40		
	3	4,16±0,01	5,65±0,26	27,45±1,84		
	4	4,28±0,12	5,96±0,02	25,50±0,47	14,87±1,06	2,25±0,05

4.1 Quantificação do teor de humidade

Uma vez que não se verifica o pressuposto de esfericidade (ϵ de Huynh-Feldt $<0,7$), foi realizado o teste de Friedman. Quando comparados os 5 momentos, os resultados indicam a existência de diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo (teste de Friedman, $\chi^2(4) = 16$, $p < 0,05$).

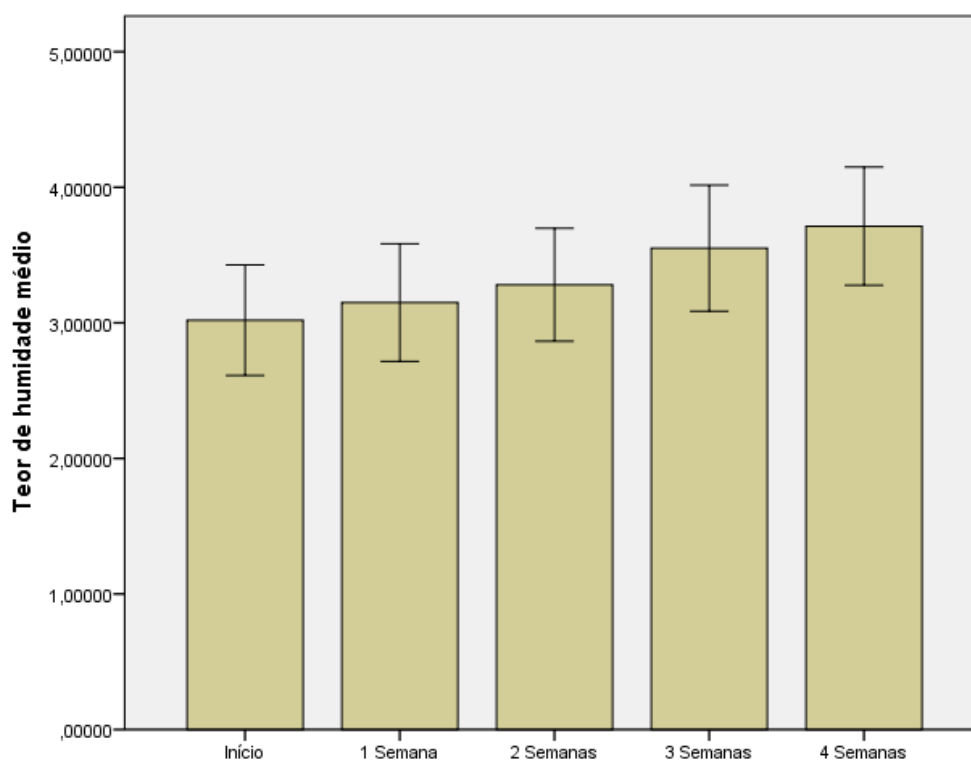


Figura 4.1. Comparação dos valores médios de teor de humidade, quando comparados os valores das 5 semanas. As colunas representam os valores médios de teor de humidade. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Como sugere a figura 4.1, o teor médio de humidade aumentou ao longo do tempo, sendo para a fórmula FME 0,66%, para FPT1 0,50%, para FPT2 0,80% e para FPT3 0,74%.

Para avaliar se o teor de humidade aumentou significativamente no decurso da experiência, recorreu-se ao teste t-Student para amostras emparelhadas. Observou-se um aumento estatisticamente significativo do teor de humidade do início da experiência (média=3,02) para o final (média=3,71) ($t(3) = -3,486$, $p < 0,05$).

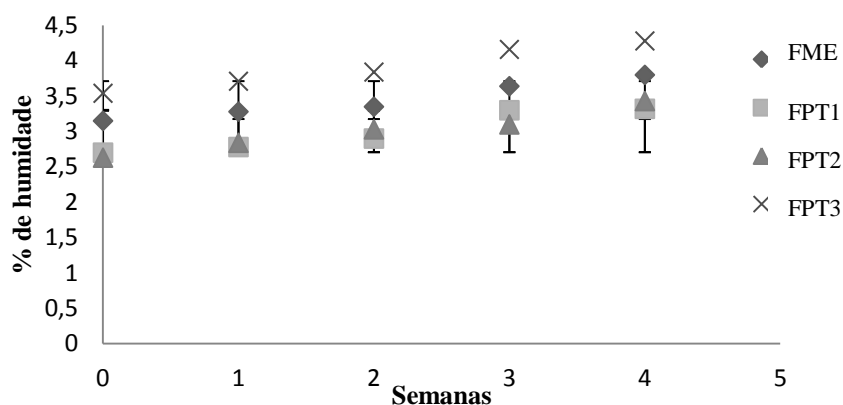


Figura 4.2. Variação do teor de humidade para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana. As linhas verticais correspondem aos valores do Desvio-Padrão (DP).

As formulações infantis são higroscópicas e tendem a absorver água da atmosfera. O teor de humidade aumentou ao longo das quatro semanas de ensaios para as quatro fórmulas. As fórmulas FME e FPT3 foram as que exibiram um teor de humidade mais elevado no início da análise, aumentado em $3,14\% \pm 0,18\%$ e $3,54\% \pm 0,49\%$, respetivamente, ao longo das quatro semanas. As restantes amostras possuíam valores relativamente inferiores, sendo que a fórmula FPT2 continha um teor de humidade de $2,63\% \pm 0,47$ e a fórmula FPT1 de $2,76\% \pm 0,21$.

O aumento do teor de humidade pode justificar-se pelo fato da lactose existente no leite em pó ter a capacidade de absorver água da atmosfera e, num certo instante, transitar diretamente do estado amorfo para o estado cristalino (Celestino et al, 1997). Erhinyodavwe et al (2009) determinou o teor de humidade em diferentes fórmulas lácteas e constatou estar compreendido entre 0,90 e 2,45%. Semeniuc et al (2012) refere valores entre 2,25% e 3,75% para fórmulas lácteas e estipula um limite máximo de teor de humidade na ordem de 3% Fitzpatrick et al (2005) analisou dois tipos de leite em pó e refere valores entre 3,3% e 4,7%.

Os valores médios de teor de humidade obtidos para as fórmulas FME, FPT1 e FPT2 ($3,80\% \pm 0,30$; $3,30\% \pm 0,30$ e $3,43\% \pm 0,10$, respetivamente), ao longo das 4 semanas encontram-se dentro dos parâmetros descritos na bibliografia.

4.2 Quantificação do teor de cinza

O teor médio de cinza no início das análises para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3 foi respetivamente $2,27\% \pm 0,05$, $3,46 \pm 0,14$, $2,96\% \pm 0,05$ e $3,27\% \pm 0,02$ e no final foi $1,36\% \pm 0,10$, $2,44\% \pm 0,17$, $1,98\% \pm 0,03$ e $2,25\% \pm 0,05$. Quando comparadas as duas semanas analisadas, conclui-se que o teor de cinza média sofreu alterações estatisticamente significativas (Teste t-Student para amostras emparelhadas, $t(3) = 42,747$, $p < 0,05$).

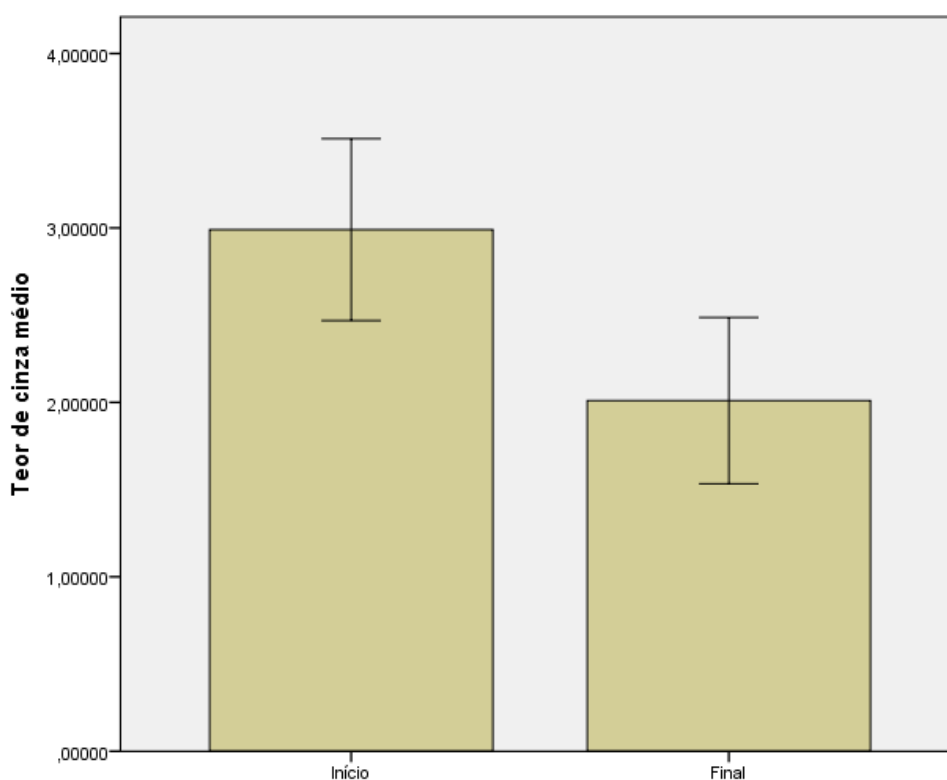


Figura 4.3. Comparação dos valores médios de teor de cinza, quando comparados os valores das semanas inicial e final. As colunas representam os valores médios de teor de cinza. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Ao analisar os resultados obtidos, figura 4.3, observou-se que o teor de cinza total sofre uma diminuição da semana 0 para a semana 4, ou seja, nas quatro fórmulas analisadas existe uma perda significativa de matéria inorgânica, sendo o teor de cinza o teor de minerais presentes num alimento, como o sódio, potássio, cálcio entre outros.

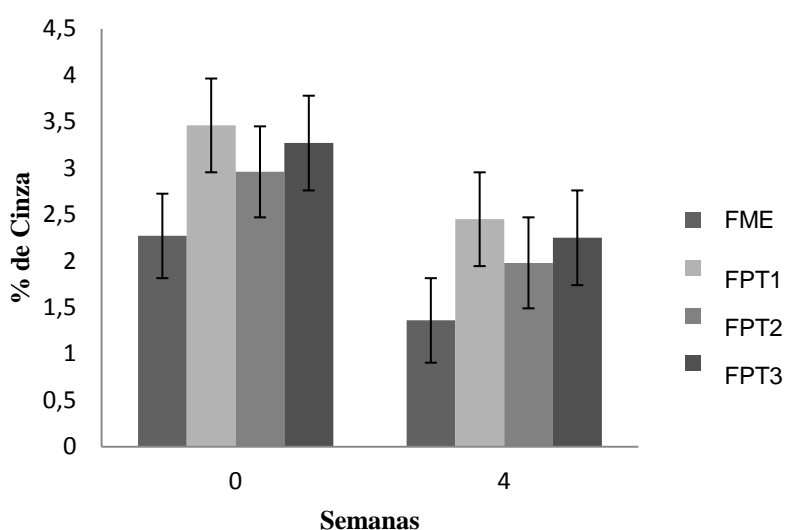


Figura 4.4. Variação do teor de cinza para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana. As linhas verticais correspondem aos valores do Desvio-Padrão (DP).

A fórmula que apresentou um menor teor de cinza inicial (semana 0) foi a fórmula FME (2,27%±0,05), para fins medicinais específicos, seguindo-se as fórmulas para prematuros FPT2 (2,96%±0,05), FPT3 (3,27±0,02) e FPT1 (3,46±0,14). Verificou-se que as fórmulas que obtiveram a maior perda de matéria mineral foram as fórmulas FPT1 e FPT2 (1,02%, e 0,98%, respetivamente) seguindo-se a fórmula FME com 0,91%.

Segundo Ekpete et al (2013) o teor de cinza em fórmulas lácteas está compreendido entre 2,30% e 3,56%. Os valores obtidos nesta análise são concordantes com os valores reportados pelo autor supracitado.

4.3 Quantificação do teor de acidez

Quando comparados os dados dos 5 momentos em que as fórmulas foram analisadas, os resultados obtidos no teste ANOVA de medidas repetidas com uma correção de Huynh-Feldt ($\epsilon=0,871$) mostram que a acidez sofreu alterações estatisticamente significativas entre os diferentes períodos de tempo $F(3,484;10,451) = 8,613, P < 0,05$.

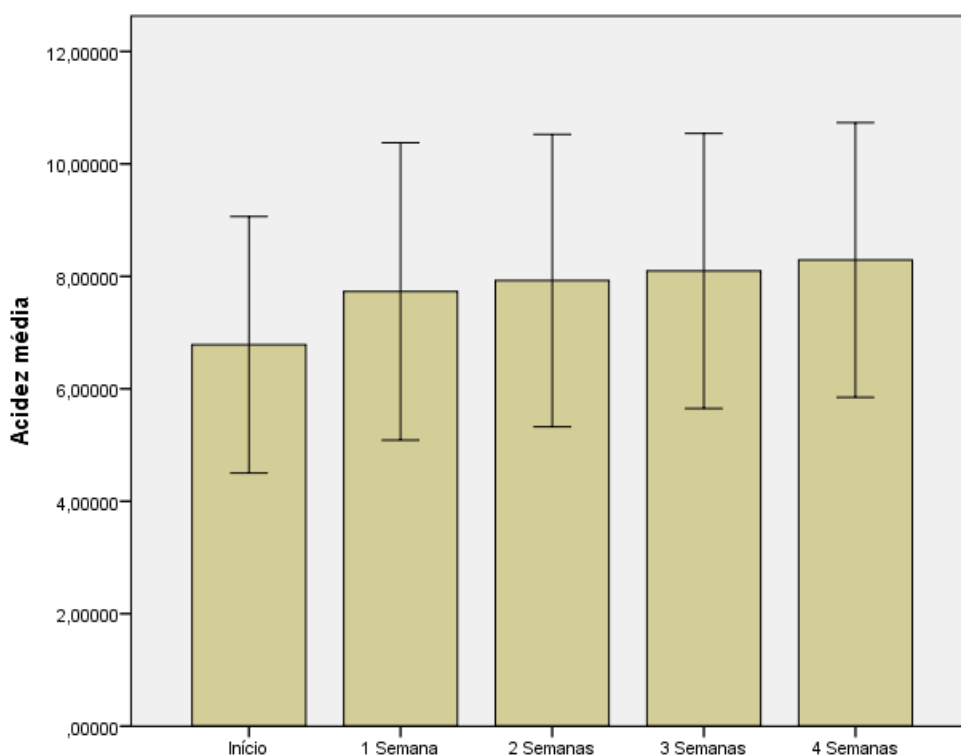


Figura 4.5. Comparação dos valores médios de teor de acidez, quando comparados os valores das 5 semanas. As colunas representam os valores médios de teor de acidez. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

A figura 4.5 mostra que a % média de acidez aumentou gradualmente sendo que a fórmula FME sofreu um aumento de 2,46% a fórmula FPT1 1,67% a fórmula FPT2 0,42% e a fórmula FPT3 1,31%.

Adicionalmente, realizou-se um teste t-Student para amostras emparelhadas, comparando a % de acidez média nos momentos inicial e final deste estudo, concluindo-se que a diferença de acidez média do início para o fim da experiência é estatisticamente significativa ($t(3) = -3,486$; $p < 0,05$).

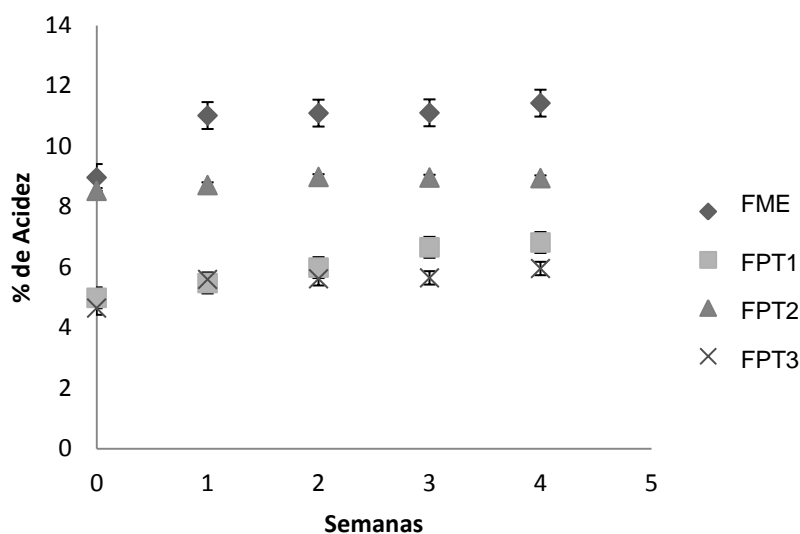


Figura 4.6. Variação do teor de acidez para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana. As linhas verticais correspondem aos valores do Desvio-Padrão (DP).

Verificou-se um aumento do teor de acidez ao longo das quatro semanas de ensaios. As fórmulas FPT3 e FPT1 foram as que apresentaram valores mais baixos no início dos ensaios ($4,66\% \pm 0,57$ e $4,99\% \pm 0,01$, respetivamente). As fórmulas FPT2 e FME apresentaram valores iniciais de acidez muito próximos ($8,53\% \pm 0,58$ e $8,97\% \pm 1,01$, respetivamente).

Comparando as diferentes fórmulas é possível verificar que as fórmulas FME, FPT1 e FPT3 foram as que sofreram um maior aumento do teor de acidez da semana 0 para a semana 1. A fórmula FPT2 apresentou valores de acidez relativamente constantes ao longo de 4 semanas. As análises efetuadas por Semeniuc et al (ano2012) em fórmulas lácteas revelam um teor de acidez entre 2%-7%. Os valores obtidos no presente trabalho encontram-se acima dos valores obtidos pelo supracitado autor. O aumento significativo do teor de acidez pode dever-se à formação de CO_2 pela reação de Maillard, e de ácido láctico (Semeniuc et al 2012).

4.4 Quantificação do teor de azoto total

Como se ilustra na representação gráfica do 4.7 o teor médio de azoto total aumentou, do início da experiência (média=13,85) para o final (média=15,45).

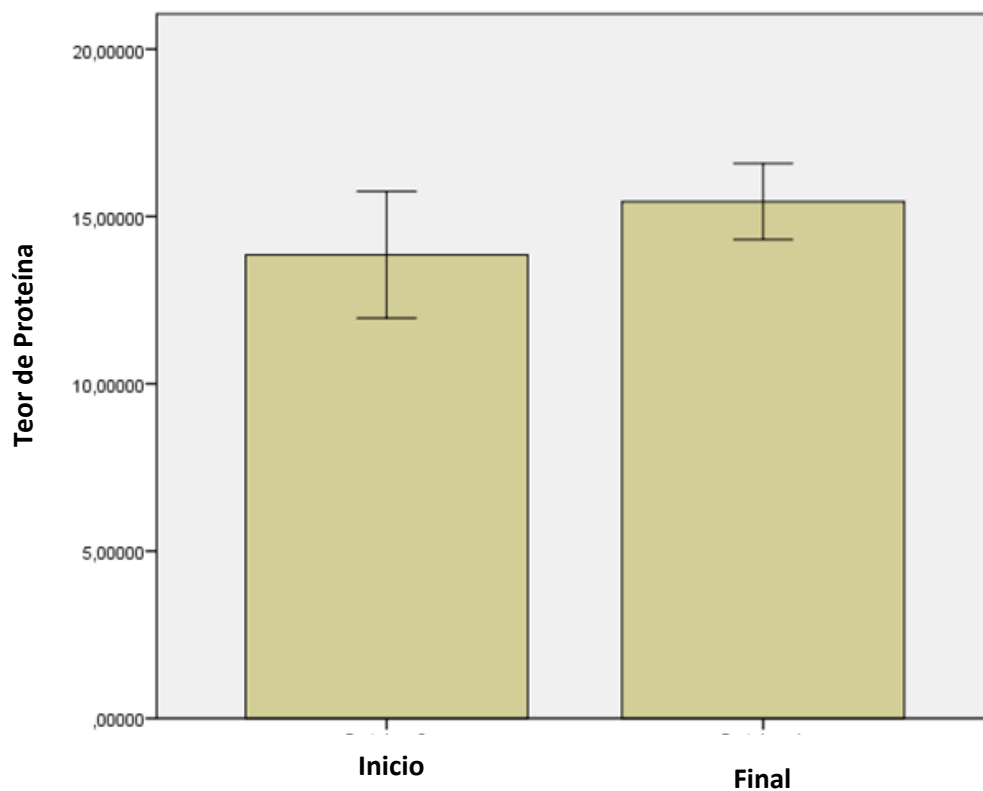


Figura 4.7. Comparação dos valores médios de teor de proteína, quando comparados os valores das semanas inicial e final. As colunas representam os valores médios de teor de proteína. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Recorrendo ao teste t-Student para amostras emparelhadas, observou-se um aumento estatisticamente significativo do teor de azoto total ($t(3) = -2,725$, $p < 0,05$).

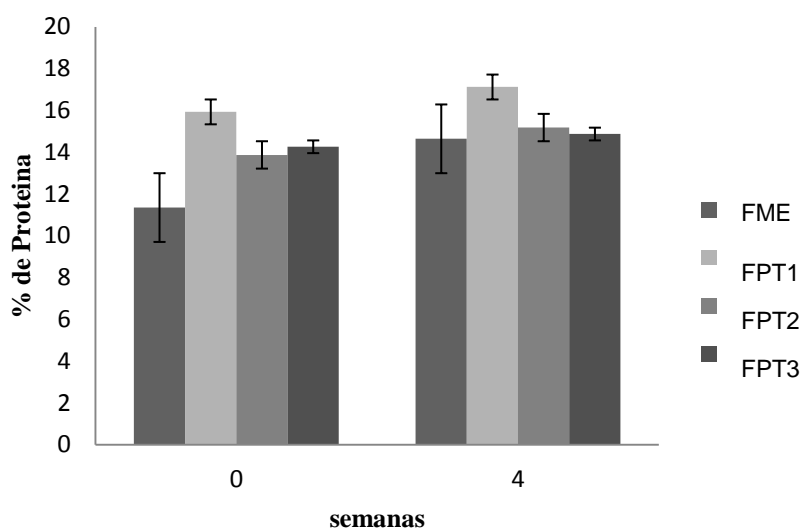


Figura 4.8. Variação do teor de proteína para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana. As linhas verticais correspondem aos valores do Desvio-Padrão (DP).

A fórmula que apresentou um menor teor de proteína foi a fórmula FME (2,38g/ 100 Kcal) destinada a fins medicinais específicos. A fórmula FPT1 apresentou o valor mais elevado (3,11g/ 100 Kcal), seguindo-se a fórmula FPT3 (2,85g/ 100 Kcal) e, por fim, a fórmula FPT2 (2,73g/ 100 Kcal). Diversos autores (Atkinson et al, 1981; Atkinson et al, 1983 e Lucas et al, 1984) referem que as fórmulas para prematuros são desenvolvidas com um perfil de nutrientes diferente do leite humano e de fórmulas de termo dado que os prematuros têm um melhor crescimento quando a fórmula é suplementada com proteínas e sais minerais.

Segundo o decreto-lei nº217/ 2008 e o “*European Union for the composition of stating infant milk formula*” os valores obtidos na semana 0 encontram-se dentro dos limites estabelecidos, excepto para a fórmula FPT1 que continha um valor acima do admitido na legislação (3,11 g/100 Kcal) sendo o máximo permitido de 3 g/ 100 Kcal. Na última semana duas das quatro fórmulas possuíam um valor acima do permitido, 3,07 g/100 Kcal para a fórmula FME e 3,11 g/100 Kcal para a fórmula FPT1.

4.5 Quantificação do teor de gordura

Uma vez que não se verifica o pressuposto de normalidade para os dados referentes à semana 4, foi realizado o teste de Friedman. Quando comparados os 5 momentos, os resultados indicam a existência de diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo (teste de Friedman, $\chi^2(4) = 11$, $p < 0,05$).

Como se pode observar na representação gráfica 4.10, o teor médio de gordura nas amostras analisadas, aumentou ao longo das semanas.

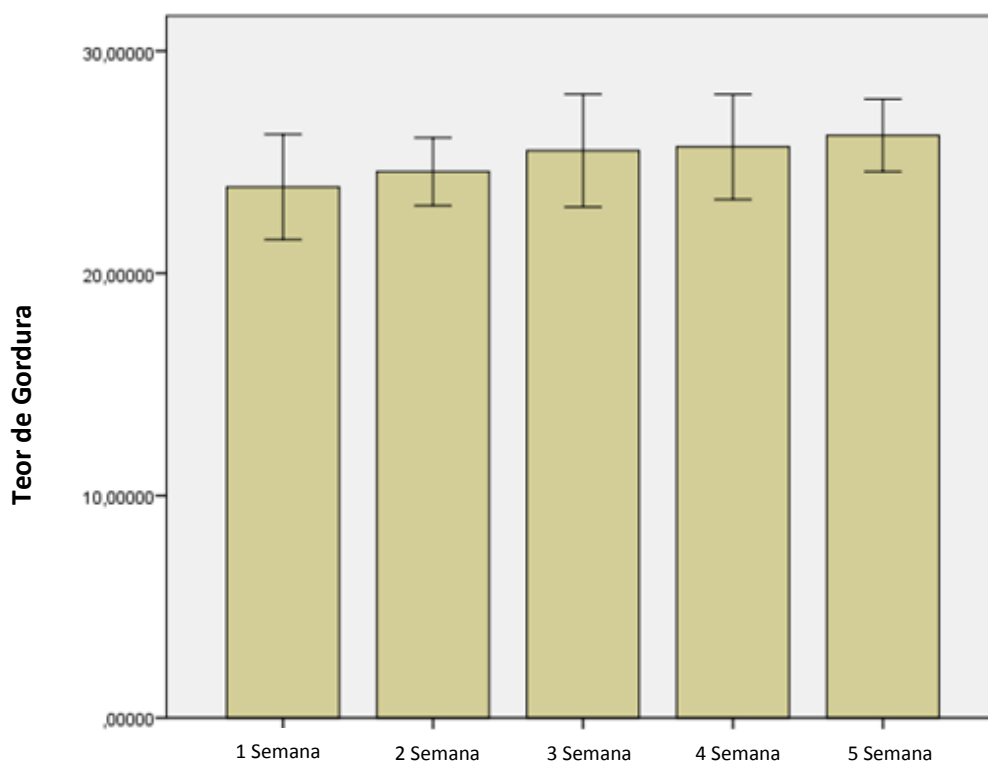


Figura 4.9. Comparação dos valores médios de teor de gordura, quando comparados os valores das 5 semanas. As colunas representam os valores médios de teor de gordura. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

De facto, desde o início da experiência até à 3.^a semana, houve um aumento significativo da percentagem média de gordura (teste t-Student para amostras emparelhadas, $t(3) = -7,589$, $p < 0,05$).

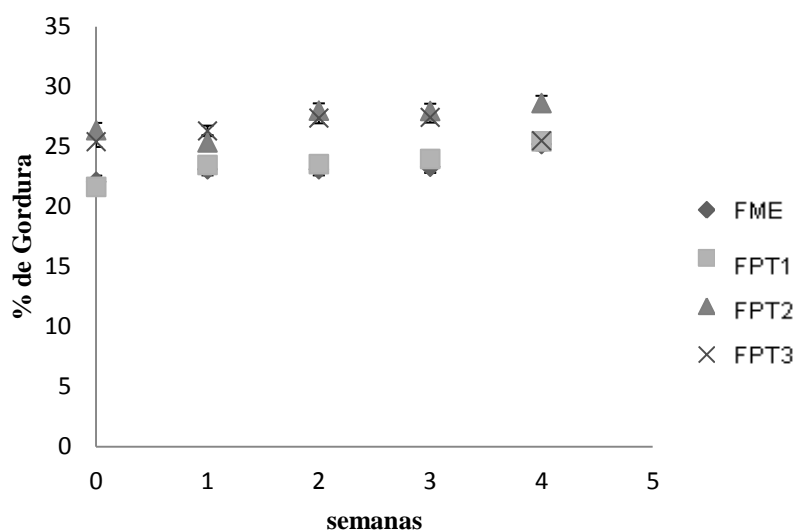


Figura 4.10. Variação do teor de gordura para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana. As linhas verticais correspondem aos valores do Desvio-Padrão (DP).

A fórmula FPT1 apresentou o menor teor de gordura (4,21 g/100 Kcal), seguindo-se FME com 4,63 g/100 Kcal, FPT3 com 5,10 g/100 Kcal e, por fim, FPT2 com 5,20 g/100 Kcal. A fórmula FME sofreu um aumento constante do teor de gordura ao longo das quatro semanas de ensaios enquanto as restantes fórmulas sofreram oscilações no seu valor.

Segundo Berlim et al (1968), a lactose amorfa é muito sensível à absorção de humidade durante o armazenamento de leite em pó. A temperatura à qual a lactose, que se encontra no estado amorfo, sofre uma transformação para o estado elástico (fluido) é conhecida como a temperatura de transição vítrea (T_g). A temperaturas superiores a T_g , a viscosidade diminui e aumenta a mobilidade molecular, permitindo que as moléculas formem uma estrutura cristalina mais ordenada (Hogan et al 2010). Assim o aumento de gordura observado ocorre devido a transformação da lactose do estado amorfo para o estado cristalino durante o armazenamento que tem efeitos prejudiciais sobre a estabilidade do leite em pó, levando assim ao aumento dos níveis de gordura livre (Kim et al 1981)

4.6 Avaliação do perfil em ácidos gordos por cromatografia gasosa

Tabela 4.2. Resultados médios obtidos para o teor de ácidos gordos onde FME corresponde á fórmula láctea destinada a lactentes dos 0-6 meses para fins medicinais específicos e FPT1, FPT2 e FPT3 às fórmulas lácteas destinadas a recém-nascido pré-termo

Ácidos gordos	FPT1					FME				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Saturados										
C8:0	3,53±0,37	1,83±1,60	3,44±0,09	3,61±0,28	3,30±0,07	1,09±0,05	0,71±0,04	0,78±0,12	0,82±0,17	0,8±0,09
C10:0	2,95±0,13	1,46±1,10	2,82±0,09	2,85±0,10	2,76±0,01	0,90±0,04	0,84±0,04	0,84±0,02	0,87±0,06	0,87±0,02
C12:0	10,1±0,18	10,50±0,99	9,54±0,17	9,47±0,09	9,27±0,23	10,97±0,19	10,87±0,27	10,79±0,27	11,16±0,28	11,33±0,09
C13:0	N.D	0,035±0,007	0,04±0,01	0,03	0,03±0,01	0,02	N.D	N.D	N.D	N.D
C14:0	4,71±0,04	4,62±0,23	4,34±0,02	4,32±9,41	4,35±0,01	4,71±0,14	4,63±0,02	4,69±0,08	4,84±0,10	4,83±0,05
C15:0	N.D	N.D	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,025±0,02	0,01	N.D	0,03±0,02	0,01
C16:0	13,9±0,15	17,32±4,03	13±0,1	12,82±0,18	13,20±0,07	19,29±0,12	13,53±3,51	14,13±4,76	20,01±0,53	
C18:0	6,34±0,08	5,35±1,42	8,41±0,36	9,12±0,47	6,34±4,69	5,32±4,55	6,13±4,70	11,22±1,50	1,62±2,71	9,38±7,91
Totais	41,53	41,115	41,62	42,25	46,15	42,325	36,72	42,45	39,35	27,22
Monoinsaturados										
C16:1	N.D	0,17±0,08	0,20±0,04	0,18±0,01	0,18	0,10±0,01	0,02	0,06±0,06	0,02	6,98±12,04
C18:1 n9	37,35±0,1	38,77±0,90	34,82±0,41	34,20±0,44	37,15±4,55	36,11±0,58	36,98±0,54	34,15±1,29	30,33±15,08	35,4
C20:1 n9	N.D	0,31±0,026	0,26±0,01	0,26±0,01	0,27	0,37±0,01	0,11±0,01	0,19±0,12	0,84±1,26	0,21±0,14
C24:1 n9	0,34	N.D	N.D	N.D	N.D	0,01	N.D	N.D	N.D	0,18±0,02
Totais	37,69	39,25	35,28	34,64	37,6	36,58	37,11	34,4	31,19	42,59
Polinsaturados										
C16:2	N.D	0,11±0,06	0,01	0,01	0,02±0,01	0,06±0,02	N.D	N.D	N.D	0,01
C16:3	N.D	N.D	0,05±0,02	0,06±0,01	0,07±0,01	N.D	N.D	0,01	N.D	N.D
C18:2 n6	17,57±0,18	15,85±3,53	19,76±0,28	19,78±0,74	19,61±0,22	13,75±0,23	14,05±0,17	13,94±0,17	13,55±0,38	12,86±0,08
C18:3 n3	N.D	0,095±0,06	0,10±0,05	0,09±0,02	0,17±0,03	N.D	N.D	N.D	13,72±0,86	N.D
C18:4 n3	1,37±0,05	2,25±0,47	1,65±0,08	1,67±0,02	1,68±0,04	2,54±0,05	1,92±1,03	2,55±0,08	2,55±0,03	2,26±0,07
C20:2	N.D	0,35±0,17	0,16±0,02	0,14±0,01	0,17	0,51±0,03	N.D	N.D	0,26±0,15	N.D
C20:4 n6	0,37±0,04	0,35±0,07	0,44±0,01	0,44±0,02	0,44±0,01	0,33±0,03	0,30±0,01	0,32±0,02	0,22±0,19	0,28±0,02
C20:5 n3	0,33±0,04	0,21±0,1	0,31±0,02	0,32	0,34±0,02	N.D	0,02±0,01	0,03	0,09±0,06	N.D
C22:5 n3	0,12±0,02	0,07±0,03	0,11±0,01	0,11±0,02	0,11±0,01	0,07±0,03	N.D	N.D	0,04±0,01	0,07±0,04
C22:6 n3	0,185±0,04	0,2±0,07	0,3±0,01	0,29±0,02	0,3±0,01	0,13±0,01	0,04	0,1±0,05	0,06±0,06	0,04±0,01
Totais	19,945	19,375	22,83	22,84	22,82	17,33	16,33	16,94	30,49	15,51

Ácidos gordos	FPT2					FPT3				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Saturados										
C8:0	11,55±8,98	0,61±3,49	18,63±0,96	26,12±0,48	11,9±10,03	19,66±0,57	18,99±0,18	10,05±7,94	0,51±0,03	6,44±10,11
C10:0	13,23±5,84	0,59±3,57	9,59±0,38	13,81±0,1	6,37±5,17	10,03±0,44	9,60±0,15	15,62±5,12	0,44±0,01	3,53±5,27
C12:0	4,85±5,79	4,10±3,65	0,72±0,04	1,07±0,05	1,81±1,86	0,92±0,04	0,72	6,58±5,04	3,85±0,09	2,95±1,87
C13:0	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,02
C14:0	0,64±0,06	2,04±3,77	0,53±0,03	0,75±0,03	1,03±0,85	0,68±0,1	0,53±0,01	0,65±0,07	2,02±0,03	1,60±0,84
C15:0	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	5,72±0,11	N.D	N.D	0,04±0,014
C16:0	3,33±3,98	12,75±3,92	5,72±0,30	6,74±0,07	8,53±4,71	6,16±0,32	0,02±0,01	2,36±3,20	17,27±0,07	13,54±6,61
C18:0	0,61±0,83	6,21±2,62	13,85±6,26	16,39±14,96		2,58±0,53	9,76±3,58	4,55±3,44	10,78±0,99	9,53±6,90
Totais	34,21	26,3	49,04	64,88	29,64	40,03	45,34	39,81	34,87	37,65
Monoinsaturados										
C16:1	3,005±4,21	N.D	N.D	N.D	N.D	0,08±0,01	N.D	N.D	0,095±0,01	0,11±0,03
C18:1 n9	1,20±0,13	3,32±2,34	1,27±1,33	2,29±1,71	4,76±3,85	35,3±0,66	1,96±2,52	1,70±1,00	43,96±1,18	41,59±5,61
C20:1 n9	1,075±1,41	0,11±6,55	0,02±0,01	0,11±0,09	0,08±0,03	0,23±0,01	0,04±0,01	1,16±1,08	0,39±0,02	0,40±0,09
C24:1 n9	N.D	0,11±6,72	N.D	1,35±0,02	N.D	0,03	N.D	N.D	0,03±0,11	0,01
Totais	5,28	3,43	1,29	2,4	4,84	35,61	2	2,86	44,445	42,1
Polinsaturados										
C16:2	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
C16:3	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,05±0,01	N.D	N.D	0,075±0,04	0,07±0,02
C18:2 n6	5,51±6,77	7,32±2,38	17,46±5,66	8,80±3,22	6,79±5,88	20,6±0,78	10,27±9,58	10,67±11,09	16,90±0,54	18,19±2,77
C18:3 n3	2,9	3,45±1,13	N.D	N.D	N.D	1,11±1,51	N.D	N.D	N.D	N.D
C18:4 n3	5,98±5,15	1,31±0,43	1,67±0,47	1,11±0,08	2,15±0,14	2,29±0,01	2,30±0,04	5,19±5,35	1,99±0,12	2,11±0,25
C20:2	0,045±0,01	0,24±6,92	0,01±0,01	0,1±0,14	0,13±0,19	0,11±0,01	0,025±0,01	0,02±0,01	0,46±0,035	0,33±0,13
C20:4 n6	0,32±0,42	0,14±6,89	0,43±0,24	0,26±0,03	0,48±0,15	0,63±0,02	0,59±0,01	0,21±0,34	0,32±0,01	0,43±0,18
C20:5 n3	0,33±0,30	0,07±6,86	0,07±0,025	0,22±0,18	0,1±0,02	0,35	0,095±0,01	0,26±0,25	0,32±0,01	0,365±0,012
C22:5 n3	N.D	0,04±6,72	N.D	N.D	N.D	0,09±0,02	N.D	N.D	0,11±0,01	0,12±0,02
C22:6 n3	0,15±0,13	0,04±7,20	0,07	0,51±0,29	0,17±0,09	0,25±0,02	0,17±0,09	0,06±0,02	0,25±0,01	0,25±0,02
Totais	15,235	12,61	19,71	11	9,82	25,43	13,45	16,41	20,35	21,795

Quando comparadas as cinco semanas analisadas concluiu-se que o perfil em ácidos gordos não sofreu diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes períodos de tempo. Os ácidos gordos saturados (teste de Friedman, $\chi^2(4) = 2,4$, $p = 0,715$), monoinsaturados (teste de Friedman, $\chi^2(4) = 6$, $p = 0,205$) e os ácidos gordos polinsaturados (ANOVA para medidas repetidas, com correção de Huynh-Feldt, $F(4,000;12,000) = 0,918$, $P < 0,05$) não sofreram alterações estatisticamente significativas.

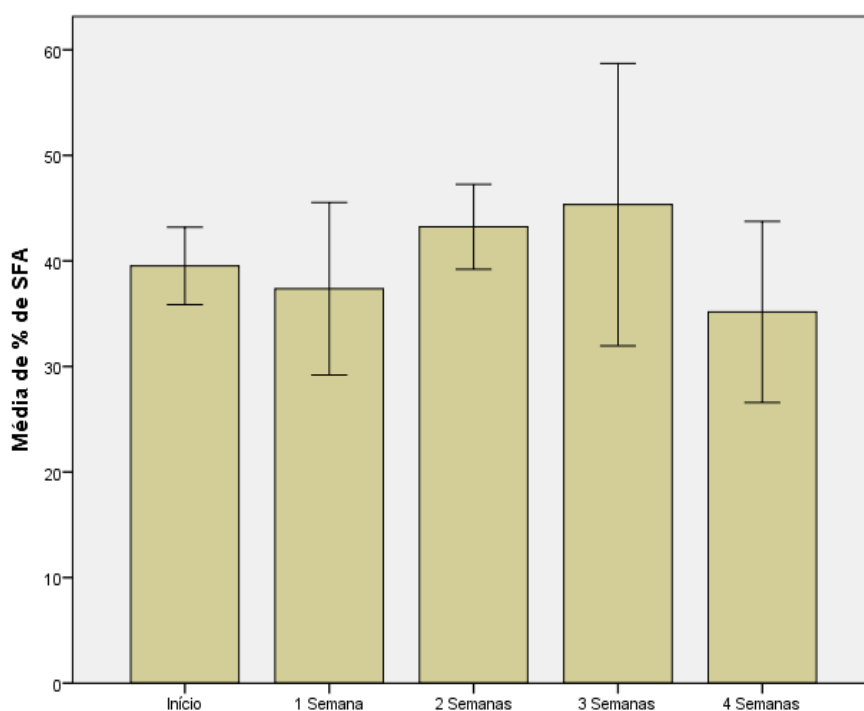


Figura 4.11. Comparação dos valores médios de teor de ácidos gordos saturados (SFA), quando comparados os valores das 5 semanas. As colunas representam os valores médios de teor de cinza. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

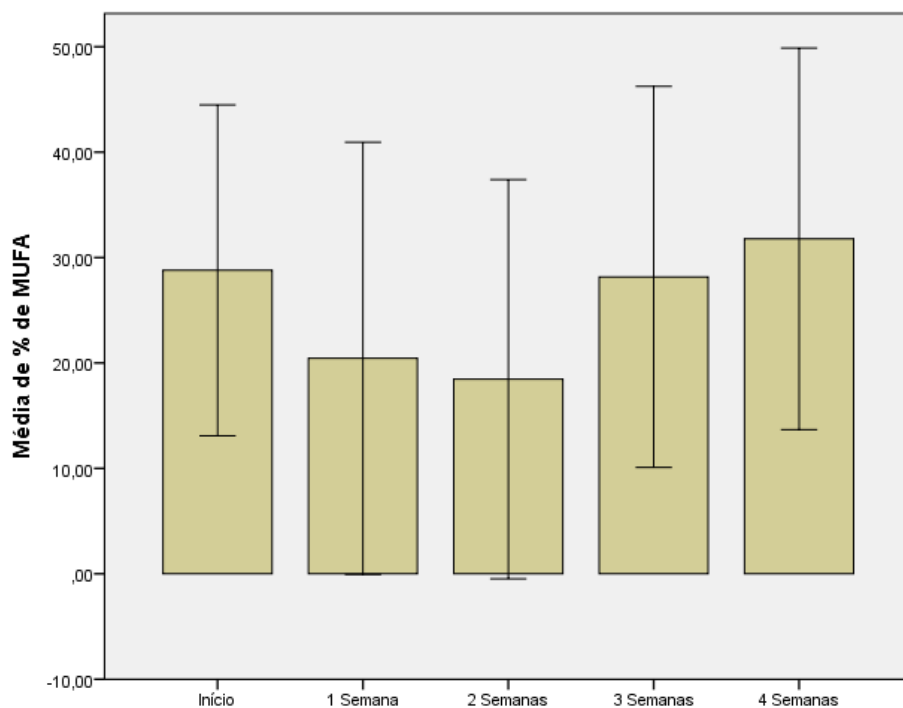


Figura 4.12. Comparação dos valores médios de teor de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), quando comparados os valores das 5 semanas. As colunas representam os valores médios de teor de cinza. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

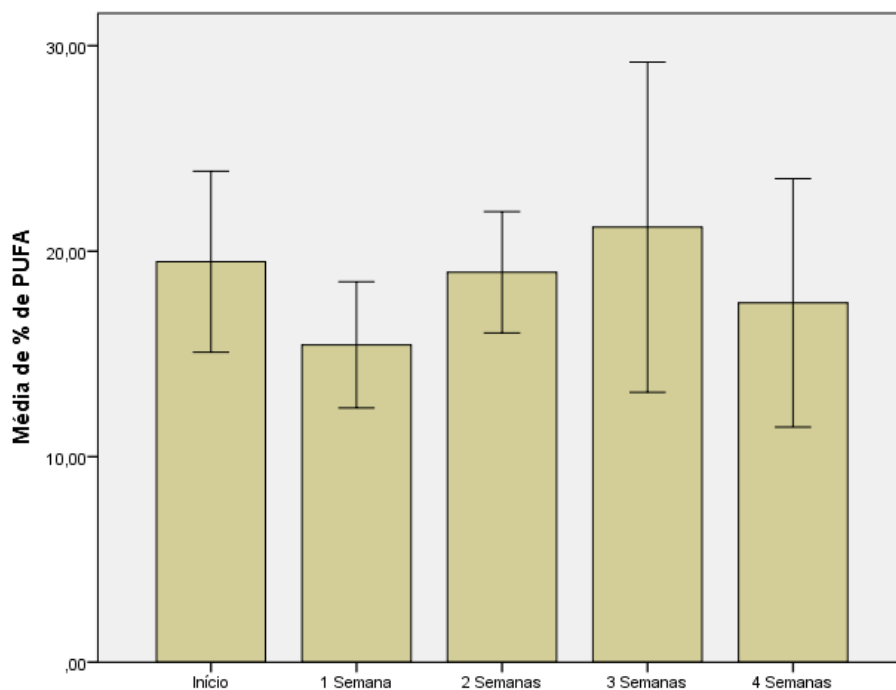


Figura 4.13. Comparação dos valores médios de teor de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), quando comparados os valores das 5 semanas. As colunas representam os valores médios de teor de cinza. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

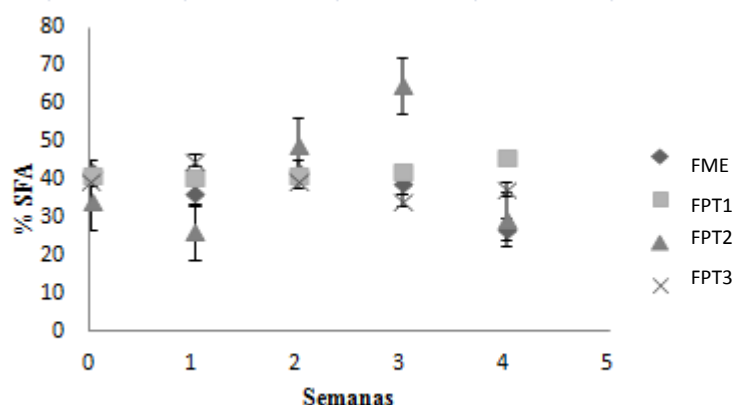


Figura 4.14. Variação do teor de ácidos gordos saturados (SFA), para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana respetivamente. As linhas verticais correspondem aos valores do Desvio-Padrão (DP).

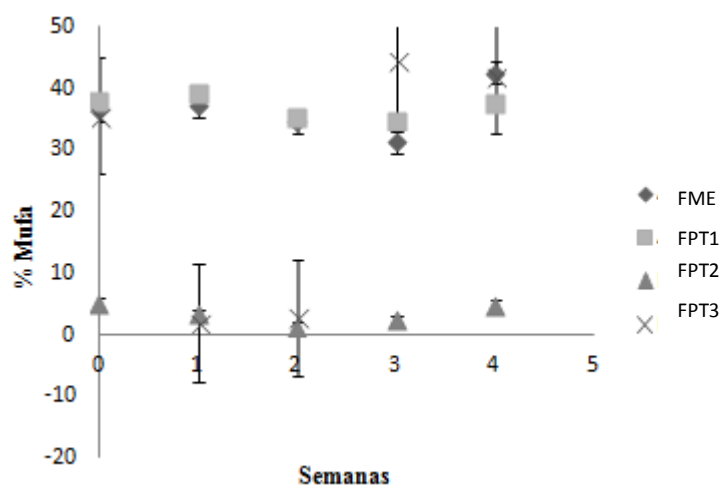


Figura 4.15 Variação do teor de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana respetivamente. As linhas verticais correspondem aos valores do desvio padrão.

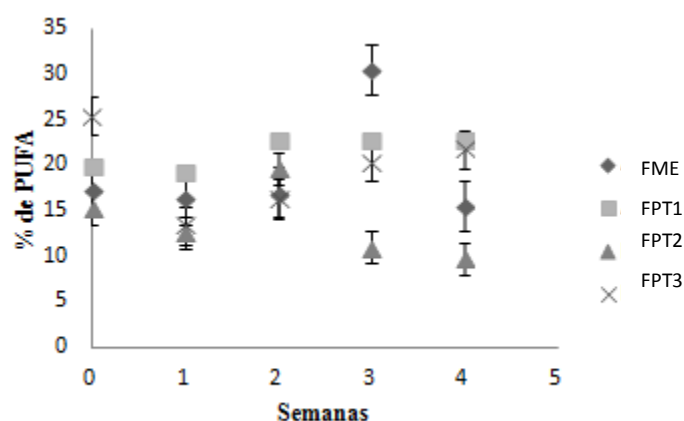


Figura 4.16. Variação do teor de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) para as fórmulas FME, FPT1, FPT2 e FPT3. Os resultados referem-se à média de quatro análises realizadas em triplicado para cada semana respetivamente. As linhas verticais correspondem aos valores do desvio padrão.

A análise do perfil em ácidos gordos para as quatro fórmulas, ao longo de 4 semanas, conduziu a resultados inconclusivos. Assim, optou-se por considerar apenas os resultados obtidos à semana 0 para as diferentes fórmulas.

Estudos desenvolvidos por Carmen et al (2010) indicam não existirem alterações do teor em ácidos gordos ao longo do período de armazenamento de diferentes fórmulas infantis, contrariamente ao observado no presente estudo.

O ácido gordo maioritário na fórmula FPT1 foi o ácido oleico (C18:1 n9) com $37,35\% \pm 0,1$ seguindo-se o ácido linoleico (C18:2 n6) com $17,57\% \pm 0,18$. O teor de ácidos gordos saturados (SFA) foi de 42,53%, sendo 13,9% ácido palmítico (C16:0). A totalidade de ácido mirístico (C14:0) e ácido láurico (C12:0) não excedeu 20% do teor de gordura total. Os LC-PUFA n-3 e n-6 não excederam o limite de 1% estipulado pelo decreto-lei. O ácido eicosapentaenóico excedeu o ácido docosahexaenóico, contrariamente ao indicado na bibliografia, Carmen et al (2010). O teor de ácido docosahexaenóico não excede o valor de LC-PUFA n-6. O somatório de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) foi 37,69% e de polinsaturados (PUFA) foi 19,45%. No estudo realizado por Carmen et al (2010) são referidos valores para os SFA de 37,26%, de MUFA 43,09% e de PUFA 19,0%, valores consistentes com os resultados obtidos no presente trabalho.

Para FME verificou-se que o ácido oleico era o ácido maioritário com $36,98\% \pm 0,54$ e que o ácido linoleico estava presente em $14,05\% \pm 0,17$. O teor de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados foram $36,72\%$, $37,11\%$ e $16,33\%$, respetivamente. Tal como para FPT1, a soma dos ácidos mirístico e láurico não excedeu 20% , os valores de LC-PUFA n-3 e de LC-PUFA n-6 também não ultrapassaram o limite legal de 1% e o ácido eicosapentaenóico excedeu o ácido docosaheptaenóico.

Os valores obtidos para FPT1 e FME estão concordantes com a bibliografia, sendo que Lopez-Lopez et al (2002) e Romeu-Nadal et al (2007) referem valores semelhantes em estudos realizados com várias fórmulas lácteas.

As fórmulas FPT2 e FPT3 não possuem valores concordantes com a bibliografia, possivelmente devido à morosidade na sua análise no cromatógrafo gasoso, que pode ter conduzido a alterações no perfil em ácidos gordos das amostras.

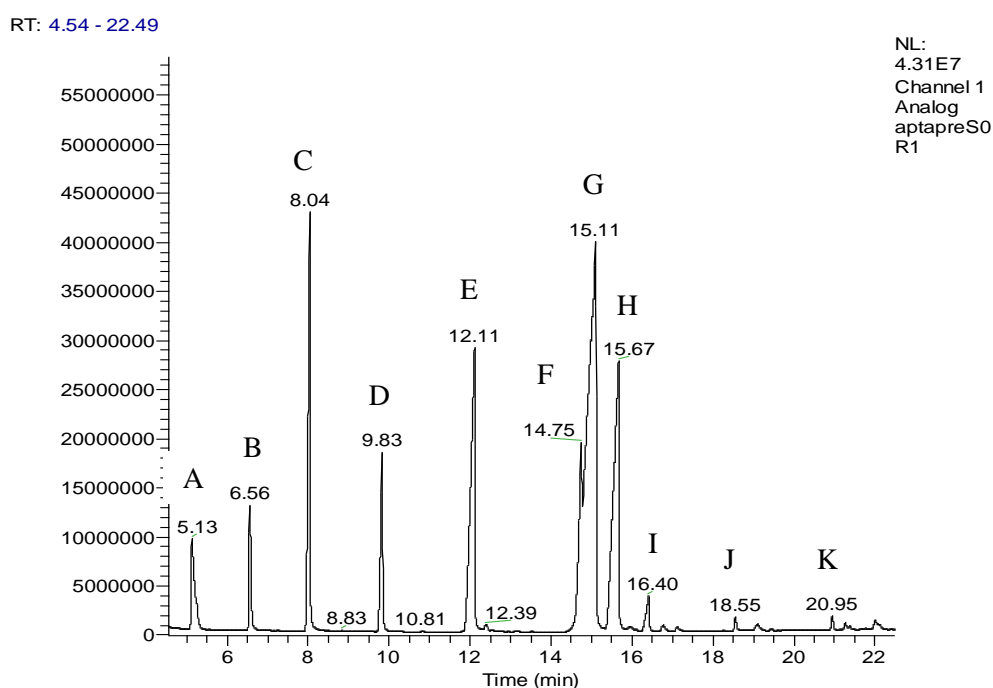


Figura 4.9. Cromatograma do perfil em ácidos gordos da fórmula FPT1 à semana 0
A- Ácido caprílico (C8:0); B- Ácido cáprico (C10:0); C- Ácido láurico (C12:0); D- Ácido mirístico (C14:0); E- Ácido palmítico (C16:0); F- Ácido esteárico (C18:0); G- Ácido oleico (C18:1 n9); H- Ácido linoleico (C18:2 n6); I- Ácido estearidónico (C18:4 n3); J- Ácido araquidónico (C20:4 n6); K- ácido nervónico (C24:1 n9).

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

No presente trabalho estudou-se a estabilidade físico-química de fórmulas infantis no que respeita ao teor de humidade, cinza, acidez, proteína, gordura e perfil em ácidos gordos.

As fórmulas para prematuros FPT2 e FPT3 sofreram o maior aumento do teor de humidade (0,80% e 0,74%, respetivamente) e também a maior perda de matéria mineral (1,02%). A fórmula para recém-nascidos a termo, FME, foi a que apresentou o maior teor de acidez inicial seguindo-se as fórmulas para recém-nascido pré-termo FPT1 e FPT3. A fórmula FPT1 apresentou o menor teor de gordura inicial e a fórmula FPT2 o maior teor. Contrariamente, FPT1 foi a fórmula que exibiu o maior teor de proteína inicial, seguindo-se as fórmulas FPT3 e FPT2.

O perfil em ácidos gordos para as quatro fórmulas não conduziu a resultados conclusivos uma vez que as análises no cromatógrafo gasoso não foram efetuadas com a celeridade desejada, pela necessidade de se respeitar a ordem de utilização do aparelho. Apesar de as fórmulas FME e FPT1 apresentarem valores inconsistentes quando analisadas as 4 semanas, foi possível discutir os resultados para a semana inicial e retirar algumas conclusões, nomeadamente, que os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados encontravam-se em proporções semelhantes às reportadas na bibliografia.

Como trabalho futuro, seria interessante testar outras temperaturas de armazenamento, procurando simular as condições de conservação no verão. Estudos de oxidação lipídica e de regiodistribuição dos ácidos gordos no TAG serão igualmente interessantes de realizar futuramente.

Sugere-se também que sejam testadas mais fórmulas, com mais replicações para cada fórmula, para ser possível uma comparação entre fórmulas para recém-nascidos pré-termo e recém-nascidos a termo. Neste trabalho, para cada fórmula, foram feitas medições em 5 momentos distintos, para 3 amostras, mas todas retiradas da mesma embalagem, pelo que não houve replicação.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguayo, J. (2001). Maternal lactation for preterm newborn infants. *Early Hum Dev*; 65 (Suppl): S19-29.

Aguilar Cordero, M. J. (2005). Composición, propiedades y bioquímica de la Leche Humana. En: Aguilar Cordero M J. *Lactancia Materna. 1ª ed. Madrid, España: Elsevier Science.*

Agostoni, C., Trojan, S., Bellu, R., Giovannini, R. M. (1995). Neurodevelopmental quotient of healthy term infants at 4 months and feeding practice - The role of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pediatr; Res.* 38, 262 – 266.

Agostoni, C., Fiocchi, A., Riva, E., et al. (2007). Growth of infants with IgE- mediated cow's milk allergy fed different formulas in the complementary feeding period. *Pediatr Allergy Immunol.* 2007; 18 (7):599-606.

Alemi, B., Hamosh, M., Scanlon, J. W., Salzman-Mann, C., Hamosh, P. (1981). Fat Digestion in very-low-birth-weight infants: effect of administration of human milk to low-birth-weight formula. *Pediatrics*; 68:484-9.

Akre, J. (1989). Infant feeding: the physiological basis. *Bull Wld Hlth Org*; 67 (suppl.):S1–S108.

Atkinson, S. A., Bryan, M. H., Anderson, G. H., (1981). Human milk feeding in premature infants: protein, fat, and carbohydrate balances in the first two weeks of life. *Pediatric*; 99:617-24.

Atkinson, S. A., Radde, I. C., Anderson, G. H. (1983). Macromineral balances in premature infants fed their own mother's milk or formula. *J. Pediatr.* 102: 99–106.

Beaudry, M., Dufour, R., Marcoux, S. (1995). Relation between infant feeding and infection during the first six months of life. *J Pediatr* ;126: 191-197.

Bernback, S., Blackberg, L., Hernell, Q. (1990).The complete digestion of human milk triacylglycerol in vitro requires gastric lipase, pancreatic colipase- dependent lipase, and bile salt-stimulated lipase. *I Clin Invest*; 85:1221-6.

Bhatia, J., Greer, F. (2008). Use of soy protein-based formulas in infant feeding .American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition.. *Pediatrics.*;121(5):1062-1068.

Bjerve, K. S., Thoresen, L., Mostad, I. L., Alme, K. (1987). Alpha-linolenic acid deficiency in man: effect of essential fatty acids on fatty acid composition. *Department of Clinical Chemistry, University Hospital, Trondheim, Norway Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*;17B:862-5.

Breckenridge, W. C. (1978). Stereospecific analysis of triacylglycerols. In: Kuksis A, ed, Handbook of lipid research 1-fatty acids and glycerides. New York: *Plenum Press.*:197-232.

Brueton, M. i., Berger, H. M., Brown,G. A., Ablitt, L., Iyngkaran. N., Wharton, B. A. (1978). Duodenal bile acid conjugation and dietary sulphur amino acids in the newborn. *Gut*; 19:958.

Butte, N., et al. (1988).Variability of macronutrient concentrations in human milk. *Eur J Clin Nutr*; 42: 345-9.

Caldeira. T., Moreira. P., Pinto. E. (2007). Aleitamento materno: estudo dos fatores relacionados com o seu abandono. *Rev Port Clin Geral*; 23:685-699.

Cardoso., L. (2006). Aleitamento Materno uma prática de educação para a saúde no âmbito da enfermagem obstetrícia [Dissertação de Mestrado]. Braga, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Carrier, H., Bernard, A., Caselli, C. (1991). Digestion and absorption of polyunsaturated fatty acids. *Reprod Nutr Dev*;31:475–500.

Carmen, M., García-Martínez., Rodríguez-Alcala L. M., Marmesat, S., Alonso, L., Fontecha, J., Márquez-Ruiz, G. (2010). Lipid stability in powdered infant formula stored at ambient temperatures, *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 2337–2344.

Cattaneo, A., Yngve, A., Koletzko, B., Guzman, Lr. (2005). Protection, Promotion and Support of Breast-Feeding in Europe: current situation. *Public Health Nutr*; 8(1):39-46.

Celestino, E. I., Yier, M., Roginski, H. (1997). The Effects of Refrigerated Storage of Raw Milk on the Quality of Whole Milk Powder Stored for Different Periods, *International Dairy Journal*, 7(2-3), 119-127.

Chan-Yeung, M., Manfreda, J., Dimich-Ward, H., Ferguson, A., Watson, W., Becker, A. (2000). A randomized controlled study of the effectiveness of a multifaceted intervention program in the primary prevention of asthma in high-risk infants. *Arch Pediatr Adolesc Med.*; 154:657-663.

Cochi, S., Flemming, D., Hightower, A. (1986). Primary invasive haemophilus influenza type B disease: A population-based assessment of risks. *J Pediatr.*; 101:804- 805.

Cohen, R. J., et al. (1994). Effects of age of introduction or complementary foods on infant breast milk intake, total energy intake, and growth: a randomised intervention study in Honduras. *Lancet*; 344:288-293.

Craig, W. R., Hanlon-Dearman, A., Sinclair, C., Tabackm, S., Moffatt, M. (2004). Metoclopramide, thickened feedings, and positioning for gastro-oesophageal reflux in children under two years. *Cochrane Database Syst Rev.*; (4):CD003502.

Crawford, M. A, Sinclair, A. J., Msuya, P. M., Munhambo. A. (1973). Structural lipids and their polyenoic constituents in human milk. In: Galli C, Jacini O, Pecile A, eds. *Dietary Lipids and Postnatal Development*. New York, NY: *Raven Press*;41-56.

Department of Health and Social Security, (1988). Present day practice in infant feeding: third report. *Report of a working party of the Panel on Child Nutrition, Committee on Medical Aspects of Food Policy*. London: HMSO.

Dewey, K. G., Heinig, M. J., Nommsen- Rivers, L. A. (1995). Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants. *J Pediatr*;126:696-702.

Diário da Republica. Decreto-Lei n.º217/2008, de 11 de Novembro de 2008, Número.º 219, 1º Série

Erbersdobler, H. F., Hupe, A. (1991). Determination of lysine damage and calculation of lysine bio-availability in several processed foods. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 30 46–49.

Erhinyodavwe, O., Egele, R. O., Idolor, O., Ugbune, U. (2009). The nutrient value of breast milk and some infant formulae. *Journal of Chemical society of Nigeria*, 34 (1), 64-67.

Espgan, Committee on Nutrition. Guidelines on infant nutrition III (1992). Recommendations for infant feeding. *Acta Paediatr Scand*.; 302(Suppl.): 1-27.

European Commission. Commission Directive of 14 May 1991 On infant formulae and follow-on formulae (91/321/ EEC). OJ L 175, p. 35, last consolidated 25 May 1999.

Ekpete, O. A. et al. (2013). The nutrient value of breast milk and some infant formula. The Experiment, Mar, *international journal of science and technology*; Vol. .8(2), 456-460.

Fredrikzon. B., Olivecrona, T. (1978). Decrease of lipase and esterase activities in intestinal contents of newborn infants during test meals. *Pediatric Res*;12:631-4

Fisher, J. O., Birch, L. L, Smiciklas- Wright, H., Picciano, M. F. (2000). Breastfeeding through the first year predicts maternal control in feeding and subsequent toddler energy intakes. *J Am Diet Assoc.*; 100:641-646.

Fitzpatrick, J., Barry, K., Delaney, C., Keogh, K. (2005). Assessment of the flowability of spray-dried milk powders for chocolate manufacture. *Lait* 85:269–77.

Gonzalez., Cossio, T., Habicht., J. P., Rasmussen, K. M., et al. (1998). Impact of food supplementation during lactation on infant breast-milk intake and on the proportion of infants exclusively breast-fed. *J Nutr*; 128:1692–702.

Hamosh, M. (1989). Enzymes in human milk: their role in nutrient digestion, gastrointestinal function, and nutrient delivery to the newborn infant. In: Lebenthal E, ed. Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy. 2nd ed. *New York: Raven Press*:121-34.

Hamosh, M. (2008). Fatty acids and growth and development. In *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*; Chow, C. K., Ed.; *CRC Press: Boca Raton, FL*; pp 899–935.

Hashim, S. A., Asfour, R. H. (1968). Tocopherol in infants fed diets rich in polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr*; 21:7-14.

Hogan, S. A., Famelart, M. H., O’Callaghan, D. J., & Schuck, P. (2010). A novel technique for determining glass-rubber transition in dairy powders. *Journal of Food Engineering*, 99, 76e82.

Istre, G., Conner, J., Broome, C., Broome, C., Hightower, A., Hopkins, R. (1985). Risk factors of invasive haemophilus influenza disease among children. *J Pediatr.*; 115:694-701.

ISO/TC 34/SC N789; ISO/DIS 8986- Milk and Milk Products- Determination of nitrogen content and crude protein calculation- Part 1&2: Kjeldahl principle.

Instrução de Trabalho do Laboratório de Bromatologia e Nutrição do INSA: SNBN-IT32_03, *Determinação da cinza total em produtos lácteos*, 2007, Laboratório de Bromatologia e Nutrição do INSA.

Jarvenpaa, A. L. (1983). Feeding the low-birth-weight infant IV. Fat absorption as a function of diet and duodenal bile acids. *Pediatrics*: 72: 684-9.

Jensen, R. G. (1989). Lipids in human milk-composition and fat-soluble vitamins. In: Lebenthal E, ed. Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy. 2nd ed. *New York: Raven Press*: 157-208.

Jensen, R.G., Lammi-Keefe., C, Henderson. R., Bush, V., Ferris. (1992); A Effect of dietary intake of n-6 and n-3 fatty acids on the fatty acid composition of human milk in North America; *J. Pediatr.* 120, S87 – S92

Jensen, R. G. (1995). Handbook of milk composition. San Diego: Academic Press, Inc.

Jensen, Rg. (1999). Lipids in human milk. *Lipids*; 34, 1243 – 1271.

João Marôco, *Análise Estatística Com utilização de SPSS*, 3º Edição

Kim, M. N., Saltmarch, M., & Labuza, T. P. (1981). Non-enzymatic browning of hygroscopic whey powders in open versus sealed pouches. *Journal of Food Processing and Preservation*, 5, 49e57.

Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, M., Demmelmair. H., et al. (2001). Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Dev*; 65:S3–S18.

Koletzko, B., Baker, S., Cleghorn, G., Fagundes Neto, U., Gopalan, S., Hernell, O., Seng Hock, Q., Jirapinyo, P., Lonnerdal, B., Pencharz, P., Pzyrembel, H., Ramirez-Mayans, J., Shamir, R., Turck, D., Yamashiro, Y., Zong-Yi, D. (2005). Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International

Expert Group, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*; ESPGHAN Committee on Nutrition; 41:584–599.

Lawrence. R.A., Lawrence. R.M. (2007). Bioquímica de la leche humana. En: Lawrence RA, Lawrence RM. Lactancia Materna. Una guía para la profesión médica. 6ª ed. Madrid, España: Elsevier España;. p. 111-76

Life Sciences Research Office (LSRO). (1988). American Societies for Nutritional Sciences. Assessment of Nutrient Requirements for Infant formulas. *J Nutr*;128 (Supp):2059S–2298S.

López-Lopez., López-Sabater, M. C., Campoy-Folgozo, C., Rivero-Urgell, M., Castellote-Bargallo, A. (2002). Fatty acid and sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada (Spain) and in infant formulas, *European Journal of Clinical Nutrition*; 56, 1242–1254

Lucas, A., Gore, S. M., Cole, T. J., Bamford, M. F., Dossetor, J. F. B., Barr, I., Dicarlo, L., Cork, S. & Lucas, P. J. (1984). Multicentre trial on feeding low birth weight infants: effects of diet on early growth. *Arch. Dis. Child.* 59: 722–730.

Manotas. R. (1994); Alimentación del Neonato. En: Manotas R. Neonatología. 1ª ed. Medellín, Colombia: Ed. Universidad de Antioquía;. p. 225-51.

Makrides, M., Neumann, M., Skimmer, K., Pater, J., Gibson, R. A. (1995). Are long chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy *Lancet*; 345, 1463 – 1468.

McVea, KLSP., Turner, P. D., Pepler, D. K. (2000). The role of breastfeeding in Sudden Infant Death Syndrome. *J Hum Lact.*;16:13- 20.

Métodos de análise de ácidos gordos em leite e seus derivados- Laboratório de Metabolismo Lipídico- EZN

Michaelsen. K. F., Larsen. P. S., Thomsen. B. L., Samuelsen. G. (1994). The Copenhagen cohort study on infant nutrition and growth: breast-milk intake, human milk macronutrient content, and influencing factors. *Am J Clin Nutr*; 59:600-11.

Monobe, H., Ishibashi, T., Fujishiro, Y., Shinogami, M., Yano, J. (2003). Factors associated with poor outcome in children with acute otitis media. *Acta Otolaryngol.*;123:564- 568.

Moukarze, A. A., Abdelnour, H., Akatcherian, C. (2007). Effects of a prethickened formula on esophageal pH and gastric emptying of infants with GER. *J Clin Gastroenterol.*; 41 (9):823-829.

Murphy, G. M., Singer, E. (1974). Bile acid metabolism in infants and children. *Gut*: 15:151-63.

Norma Portuguesa NP – 1090:1980, Determinação do teor de acidez no leite em pó, 1980, Instituto Português da Qualidade (IPQ).

Norma Portuguesa NP- 1089: 1980, Determinação do teor de matéria gorda no leite em pó, 1980, Instituto Português da Qualidade (IPQ).

Palmer, B. (1998). The influence of breastfeeding on the development of the oral cavity: A commentary. *J Hum Lact.*; 14:93-98.

Palmer, G. (2009). *The Politics of Breastfeeding: When Breasts are Bad for Business*. London: Pinter and Martin.

Palmer G (2009). *The Politics of Breastfeeding: When Breasts are Bad for Business*. London: Pinter and Martin.

Reyes, Vázquez. H. (2011). Características de la leche materna. En: Reyes Vázquez H, Martínez González A. *Lactancia Humana. Bases para lograr su éxito*. 1ª ed. México: Editorial Médica Panamericana;. p. 80-6.

Rodriguez. M., Koletzko. B., Kunz, C., Jensen, R. (1999). Nutritional and biochemical properties of human milk, part II. Lipids, micronutrients and active factors. *Clin. Perinatol*; 26, 335 – 359.

Romeu-Nadal, M., Chávez-Servín, J. L., Castellote, A.I., Rivero, M., López-Sabater M.C. (2005) Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas, Elsevier 756–763

Ronayne de Ferrer P. (1993). Leche humana: II. Factores que modifican su volumen y composición. *Arch Argent Pediatr*; 91:239-245.

Roschitz. B., Plecko. B., Huemer. M, et al. (2005). Nutritional infantile vitamin B12 deficiency: pathobiochemical considerations in seven patients. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*;90: F281–2.

Samour. P. Q., King K. (2010) “Pediatric Nutrition”. (4º ed.).

Scientific Committee on Food. (2003). Report of the Scientific Committee on Food on the Revision of Essential Requirements of Infant Formulae and Follow-on Formulae. Brussels, European Commission.

Schwartz, J., Drossard, C., Dube, K., Kannenberg, F., Kunz, C., Kalhoff, H., Kersting, M. (2010). Dietary intake and plasma concentrations of PUFA and LC-PUFA in breastfed and formula fed infants under real life conditions. *Eur. J. Nutr.*, 49, 189–195.

Sellmayer. A., Koletzko, B. (1999). Long chain PUFA and eicosanoids in infants-physiological and pathophysiological aspects and open questions; *Lipids* 34, 199 – 205

Shu, XO., Linet, M. S., Steinbuch, M., Wen, W. Q., Buckley, J. D., Neglia, J. P., Potter, J. D., Reaman, G. H., Robison, L. L. (1999). Breast-feeding and risk of childhood acute leukemia. *J Natl Cancer Inst.*;91:1765-1772.

Shubat, P.J., Parker, D., Huxtable, R. J., (1989). Effect of suckling and diurnal influences on the concentrations of taurine and other free amino acids in milk. *Eur J Clin Nutr*; 43:675-80.

Signer, E., Murphy, G. M., Edkins, S., Anderson, C. M. (1974). Role of bile salts in fat malabsorption of premature infants. *Arch Dis Child*;49:174- 80.

Sikorska-Wisniewska, G., Szumera, M. (2007). The role of food components in children's nutrition. In *Chemical and Functional Properties of Food Components*; Sikorski, Z. E., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL,; pp 488–504.

Semeniuc, A., Cristina, M., Sevastița, Rotar M. Anuța., Suharoschi, R. Maria, T. (2012). Influence of the storage conditions on physicochemical parameters of infant formula, *International Journal of Food Science and Technology*, Original article, 45, 2337–2344.

Sociedad Argentina de Pediatría, Comité de Nutrición. 430 / *Arch Argent Pediatr* 2006; 104(5):423-430 / *Actualización* Guía de alimentación para niños sanos de 0 a 2 años. 1ª ed. Buenos Aires: Ediciones SAP, 2001.

Tabela Portuguesa da Composição de Alimentos, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, setembro de 2013.

Thomas, M. E. C., Scher, J., Desobry-Banon, S., Desobry, S. (2004). Milk powders ageing: effect on physical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 44 (5), 297–322.

Tomarelli, R. M, Meyer, B. J, Weaber, J. R, Bernhart, F. W. (1968). Effect of positional distribution on the absorption of the fatty acids of human milk and infant formulas. *J Nutr*;95:583–90.

Thulier. D., Mercer. J. (2009). Variables associated with Breastfeeding Duration. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*; 38(3):259-268.

Uauy. R., Mena. P., Rojas. C. (2000). Essential fatty acids in early life: structural and functional role; *Proc. Nutr. Soc.* 59, 3– 15

Uauy. R., Hoffman D. R., Peirano P., Birch. D. G., Birch. E. E. (2001). Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids.*; 36(9):885-95. doi: 10.1007/s11745-001-07981.

Weaver. L. (2009). Feeding Babies in the 21st century: Breast is still the best, but for new reasons. History & Policy, disponível em URL: World Health Organization. (1981). *The International Code of Marketing of Breast-milk substitutes*. Geneva: Who

Wright, A., Holberg, C., Martinez, F. (1989). Breastfeeding and lower respiratory tract illness in the first year of life. *BMJ.*; 299:945-949

Woodruff, C. W., Bailey, M. C., Davis, J.T., Rogers, N., Coniglio, J. O. (1964). Serum lipids in breast-fed infants and in infants fed evaporated milk. *Am J Clin Nutr.*; 14:83-90.

Zoppi, G., Andreotti, G., Njai, D. M., Gaburro, D. (1972). Exocrine pancreas function in premature and full term neonates. *Pediatr Res.*; 6:880-6