



CONCENTRADO PROTEICO DE LEITE HUMANO ULTRAFILTRADO E LIOFILIZADO PARA A ALIMENTAÇÃO DE RECÉM-NASCIDOS DE MUITO BAIXO PESO

ULTRAFILTRATED AND LYOPHILIZED HUMAN MILK PROTEIN CONCENTRATE FOR FEEDING VERY LOW WEIGHT INFANTS

Leticia Herter Paper SEVERINO (in memory)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)
E-mail: drika.handball@gmail.com

Adriana YuriKO YAMASAKI
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)
E-mail: adriana.professionalsaude@gmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0009-0004-5195-4485>

Karla Rejane de Andrade PORTO
Faculdade Mato Grosso do Sul, Universidade Paulista (FACSUL/UNIP)
E-mail: portokra@gmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6309-8696>

Simone Cristina CRUZ
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)
E-mail: simonecristinacruz75@gmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0009-0003-2102-4191>

Camila Beatriz de Paula PEREZ
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)
E-mail: camilabpp@gmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8256-6133>

César Augusto SOBRINHO
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)
E-mail: cesarsobrinho1968@gmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4277-9775>

Melina Gomes BORGES
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)
E-mail: melina.gbbio@gmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0009-0007-8788-7810>

Durval Batista PALHARES¹
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)
E-mail: dppalhares@hotmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4300-6125>

RESUMO

O trabalho teve como objetivo desenvolver um concentrado proteico, ultrafiltrado e liofilizado a partir de leite humano (LH) para a alimentação de recém-nascidos de muito baixo peso. Foi realizado um estudo experimental com 5 amostras de leite humano cru de um banco de leite. Amostras de 25 mL de leite humano previamente desnatado foram ultrafiltradas a uma temperatura de 6 °C e uma pressão de 5 bar. Para remoção desejada da lactose (> 80%) foram necessárias 4 etapas de diafiltração. Após a reconstituição do concentrado proteico ultrafiltrado e liofilizado no LH, houve um aumento proteico de $1,06 \pm 0,34$ para $2,04 \pm 0,43$ g/dL ($p < 0,0001$), com uma osmolalidade final de 360 mOsm/Kg. O concentrado produzido neste estudo mostra ser um suporte proteico seguro e viável, pois apresenta uma osmolalidade próxima à fisiológica e atende às necessidades proteicas na dieta enteral recomendada aos recém-nascidos de muito baixo peso.

Palavras-chave: Lactose. Ultrafiltração. Suplementos Dietéticos. Lactente. Prematuro.

ABSTRACT

Objective: To develop a protein concentrate, ultrafiltered and lyophilized from human milk (HM) for feeding very low birth weight infants. Methods: Experimental study with 5 samples of raw human milk from a milk bank. The samples went through the

¹ Nota de rodapé:

Eu (Dr. Durval Batista Palhares) e coautores deste artigo, reconhecemos o grande trabalho que Letícia N. Herter Severino contribuiu para a coleta de dados durante a pesquisa que deu origem a este artigo e, mesmo doente, ela participou não apenas da coleta de materiais e exames laboratoriais, mas também concluiu seu mestrado. Ela é coproprietária da publicação.

Footnote:

I (Dr. Durval Batista Palhares) the co-authors of this paper, recognize the great work that Letícia N. Herter Severino contributed to the collection of data during the research that gave rise to this article and, even though she was ill, she participated not only in the collection of materials and laboratory test, but also, she completed her Master's degree. She is part owner of the publication.

CONCENTRADO PROTEICO DE LEITE HUMANO ULTRAFILTRADO E LIOFILIZADO PARA A ALIMENTAÇÃO DE RECÉM-NASCIDOS DE MUITO BAIXO PESO. Leticia Herter Paper SEVERINO; Adriana YuriKO YAMASAKI; Karla Rejane de Andrade PORTO; Simone Cristina CRUZ; Camila Beatriz de Paula PEREZ; César Augusto SOBRINHO; Melina Gomes Borges; Durval Batista PALHARES D. JNT Facit Business and Technology Journal. QUALIS B1. ISSN: 2526-4281 - FLUXO CONTÍNUO. 2024 - MÊS DE AGOSTO- Ed. 53. VOL. 01. Págs. 335-348. <http://revistas.faculdefacit.edu.br>. E-mail: jnt@faculdefacit.edu.br.

following procedures: Determination of acidity in Dornic degrees; Ultrafiltration; Determination of protein and lactose of the initial feed, permeate and final feed of ultrafiltration; Lyophilization; Reconstitution; Analysis of the macronutrient content and Osmolality of human milk added with the protein concentrate. Samples of 25 mL of previously skimmed human milk were ultrafiltered at a temperature of 6 °C and a pressure of 5 bar. 4 steps of diafiltration were required for the desired removal of lactose (> 80%). Results: Quantitative analyzes of lactose and initial and final HM ultrafiltered proteins were, respectively: lactose 6.90 ± 0.39 and 0.92 ± 0.11 g/dL ($p = 0.0002$); proteins 0.66 ± 0.11 and 0.93 ± 0.13 g/dL ($p < 0.0001$), demonstrating the efficiency in removing lactose and the absence of protein loss in the technique. After reconstitution of the lyophilized ultrafiltered protein concentrate in HM, there was a protein increase from 1.06 ± 0.34 to 2.04 ± 0.43 g/dL ($p < 0.0001$) with a final osmolality of 360 mOsm/Kg. Conclusions: The concentrate produced in this study shows to be a safe and viable protein support, as it presents osmolality close to physiological and meets the needs of very low birth weight infants related to the recommended enteral protein intake.

Keywords: Lactose. Ultrafiltration. Milk Banks. Dietary Supplements. Infant. Premature.

INTRODUÇÃO

O leite humano é o melhor alimento para todos os recém-nascidos, especialmente para os recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer (RNMBP) e também para os de baixo peso ao nascer (RNBP). No entanto, devido à imaturidade gástrica e metabólica dos recém-nascidos prematuros, ocorre uma ingestão inadequada de proteína, e mesmo com o uso de leite humano de banco é necessário adicionar uma suplementação proteica ao leite para garantir o crescimento e o ganho de peso.

Os fortificadores de leite humano comercialmente disponíveis usados na alimentação de recém-nascidos prematuros, em sua maioria, contêm multinutrientes, fornecendo ao leite humano de banco proteínas, minerais, vitaminas, eletrólitos e

lipídios, porém a proteína bovina constitui seu ingrediente principal. Seu uso está associado a taxas aumentadas de intolerância alimentar, distensão abdominal, marcadores inflamatórios intestinais e enterocolite necrosante.

Com isso, o leite humano tem sido manipulado para produzir um fortificador homólogo, ou seja, produzido a partir do próprio leite humano que atende às necessidades nutricionais dos prematuros sem trazer riscos à sua saúde. Alguns estudos mostraram que, a fortificação do leite humano com componentes isolados pode trazer benefícios para os RNMBP, especialmente para manter os níveis recomendados de ingestão de proteína.

Uma preocupação importante durante a produção do fortificador é o aumento da osmolalidade devido às mudanças na concentração de nutrientes e ao aumento do conteúdo de lactose, que altera as características químicas do leite humano.

A pesquisa sobre o uso de tecnologia de membrana no leite humano para remover lactose e aumentar a concentração de proteínas na alimentação de RNMBP é escassa, portanto, o presente estudo propõe desenvolver um concentrado de proteína de leite humano ultrafiltrado e liofilizado para a alimentação desses bebês, com conteúdo quantitativamente definido de macronutrientes e osmolalidade adequada.

MÉTODO

Este é um estudo experimental com amostras de leite humano cru do Banco de Leite Humano do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian / HUMAP / EBSEH e da Associação Beneficente de Campo Grande, Hospital Santa Casa.

Os critérios de seleção das amostras incluíram leite de mães lactantes com leite maduro, mas considerado impróprio para consumo devido à presença de contaminação ou ausência de diagnóstico laboratorial prévio da mãe lactante. Amostras com acidez titulável (método Dornic) superior a 4 foram excluídas, e 5 amostras foram selecionadas conforme os critérios estabelecidos.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob o número 2.920.429. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Metabolismo e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e

no Laboratório de Processos de Separação com Membranas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

A ultrafiltração do leite humano é um método que concentra e fraciona em fases aplicando-se pressão e difusão em uma membrana semipermeável; moléculas maiores (proteínas) são retidas, enquanto moléculas menores (água, lactose e sais minerais) são permeadas. Isso é complementado pela diafiltração, que promove a diluição do produto durante o processo.

O experimento de ultrafiltração utilizou um sistema de bancada equipado com um tanque de aço inoxidável com controle de temperatura, agitador magnético e membrana Microdyn Nadir 30kDa (PESH UH030) com uma área de 12,6 cm².

A ultrafiltração foi realizada em modo diafiltração com 5 amostras de 25 mL de leite humano cru desnatado. O volume inicial foi definido pela capacidade do tanque de alimentação e pelo cálculo do fluxo de permeação. As amostras de leite de 30 mL foram descongeladas em um banho-maria a 40 °C, foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos, resultando em 27 mL de leite, dos quais 25 mL foram separados para ultrafiltração e 2 mL para análise posterior. Aproximadamente 25 mL de água ultrapura foram adicionados ao tanque de alimentação da unidade de ultrafiltração a uma temperatura de 6 °C e uma pressão de 5 bar. Foram aplicadas quatro etapas de diafiltração para remover a lactose ($\geq 80\%$), com a adição de 25 mL de água ultrapura em cada etapa do processo. A concentração de lactose no permeado das diafiltrações foi verificada a cada etapa.

O conteúdo de lactose foi determinado pela quantificação de açúcares redutores pelo método colorimétrico do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), e a determinação das proteínas pelo método Bradford (1976) lido a 540 nm. Em todas as análises, curvas de calibração foram construídas com padrões de referência.

Um volume de 20 mL do concentrado ultrafiltrado foi congelado em um ultrafreezer a -22 °C por 72 horas para subsequente liofilização em um equipamento de bancada L101 (Liobras®, SP, Brasil). As amostras foram pesadas em uma balança de precisão e a média do pó do concentrado ultrafiltrado liofilizado foi obtida.

A osmolalidade foi quantificada após a reconstituição do concentrado ultrafiltrado liofilizado em 10 mL de leite humano fresco, com a concentração

peso/volume (p/v) previamente definida em um estudo piloto, e determinada pelo método crioscópico (Henriques; Rosado, 1999).

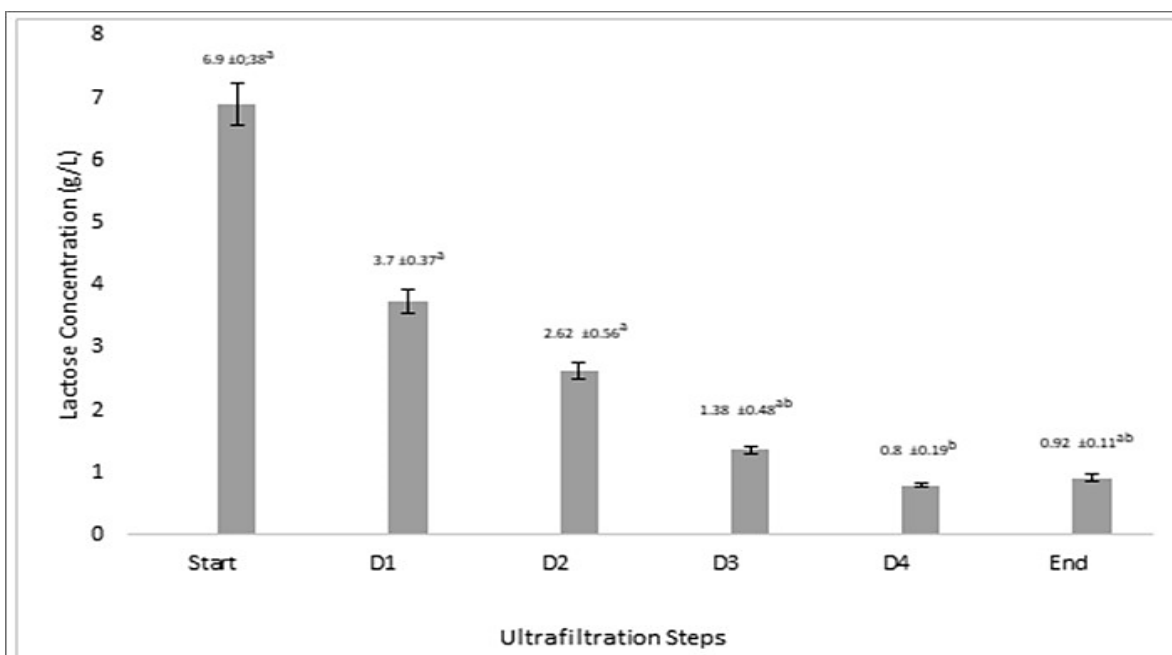
Os conteúdos de lipídios, proteínas, carboidratos totais e energia do leite materno cru e do produto liofilizado foram medidos pelo método analítico de espectroscopia no infravermelho no Analisador de Leite Humano Miris HMA™. Todo o processo seguiu os padrões para operação de banco de leite humano e controle microbiológico.

Os dados foram expressos como valores médios com seus respectivos desvios padrão, representados por figuras gráficas. Os dados apresentaram distribuição não paramétrica nos diferentes tempos entre as etapas de ultrafiltração. A comparação da concentração de lactose entre os tempos de ultrafiltração foi realizada pelo teste de Friedman, seguido pelo pós-teste de Dunn. Enquanto a concentração de proteínas, que apresentou distribuição paramétrica, foi verificada por ANOVA e pelo pós-teste de Tukey. A análise comparativa entre as diferentes amostras de leite foi avaliada pelo teste t pareado de Student. Utilizou-se o software estatístico Bioestat 5.0, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

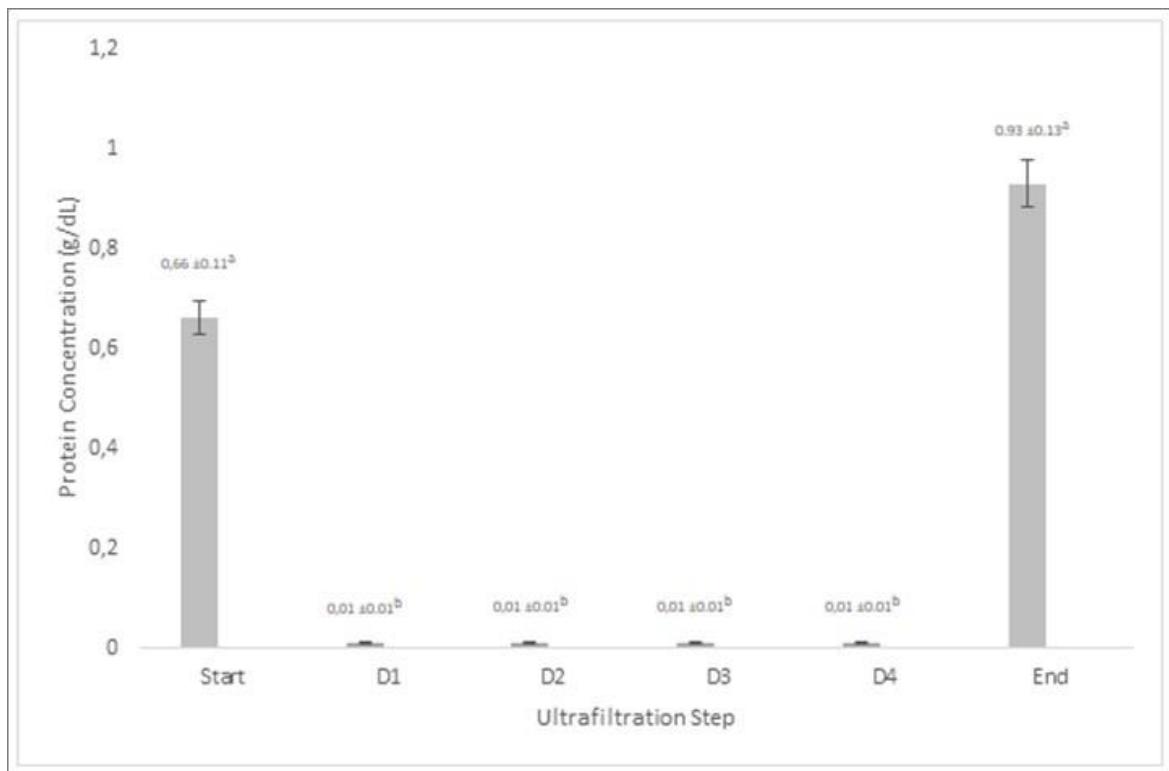
A taxa de fluxo média geral do processo variou entre 5,1 e 8,7 L m² h⁻¹, e quatro ciclos de diafiltração mostraram alterações significativas nas concentrações de lactose durante o processo (p=0,0002), evidenciando a eficácia do método ao comparar o valor na amostra inicial e após as quatro fases da técnica, com uma diminuição (figura 1). O oposto foi observado na quantidade de proteína, que aumentou após a diafiltração (figura 2), permitindo afirmar que no sistema não há perda de proteína durante a remoção da lactose. Isso apenas indica a desidratação das amostras por grama, resultando em um peso final de 0,59 ± 0,11 g de pó (1:33 p/v) e um valor médio de proteína total de 31,58 ± 3,32%.

Figura 1. Concentrações de lactose em diferentes momentos da ultrafiltração do LH. Campo Grande, 2020.



Início: D1, D2, D3, D4. Fim: Permeado coletado em cada ciclo de diafiltração. As letras nas colunas referem-se a diferenças significativas de acordo com o teste de Friedman e o pós-teste de Dunn ($p=0,0002$).

Figura 2. Concentrações de proteínas em diferentes momentos da ultrafiltração do LH. Campo Grande, 2020.

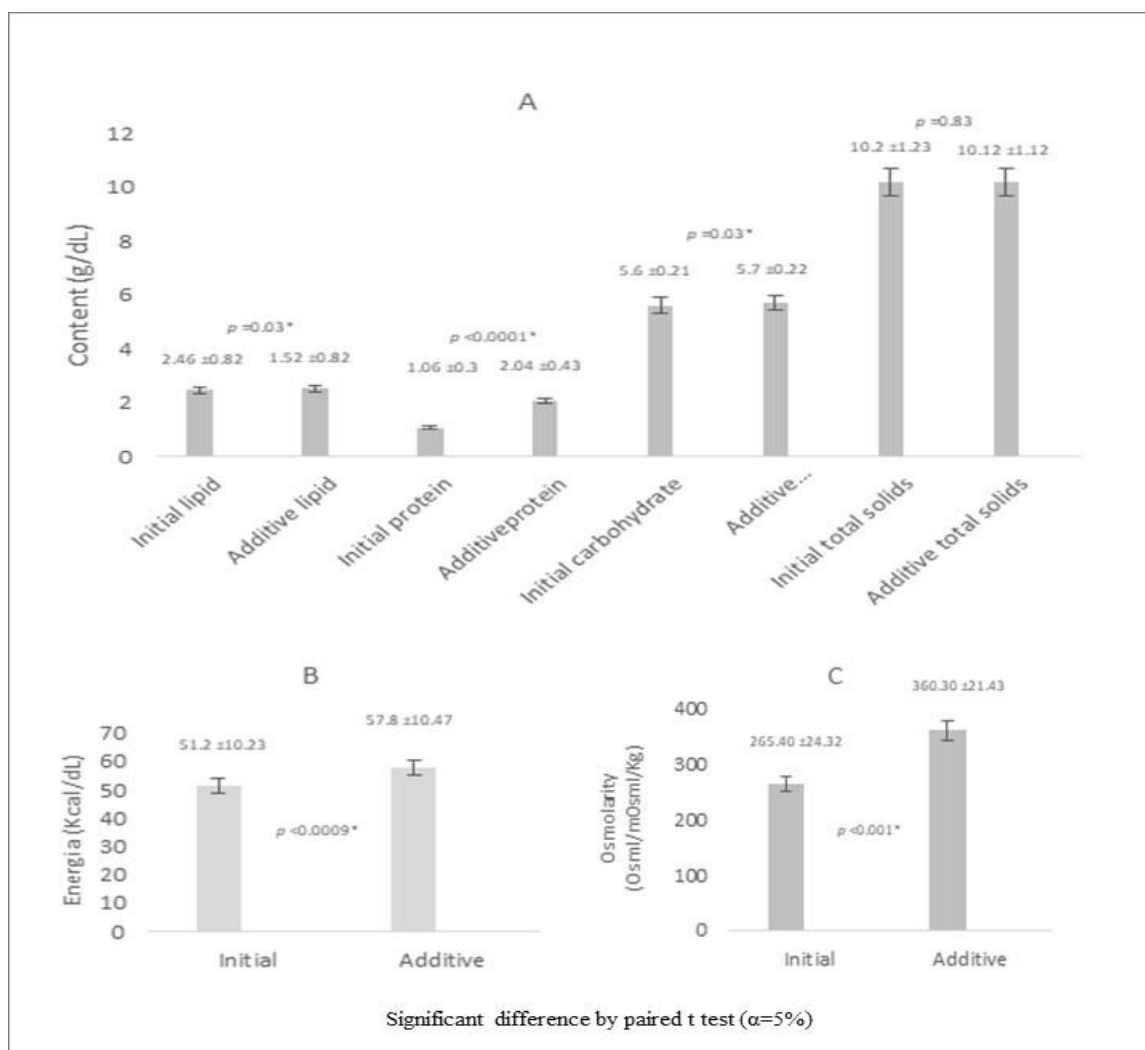


Início: D1, D2, D3, D4, Fim: Permeado coletado em cada ciclo de diafiltração. As letras nas colunas referem-se a diferenças significativas de acordo com a ANOVA de medidas repetidas e o pós-teste de Tukey ($p < 0,0001$).

O concentrado de proteína ultrafiltrado e liofilizado foi reconstituído com leite humano do mesmo lote de onde as amostras foram coletadas. Não houve diferença após a adição nos conteúdos de lipídios ($p=0,21$) e sólidos totais ($p=0,83$), mas houve ganhos em relação à concentração de proteínas ($p < 0,0001$), carboidratos ($p=0,03$), energia ($p=0,0009$) e osmolalidade ($p=0,001$), conforme mostrado na figura 3.

O processo de ultrafiltração por diafiltração provou ser eficaz para a remoção da lactose do leite humano, com uma redução média de $86,7 \pm 1,2\%$, e manteve a osmolalidade abaixo de 450 mOsm/Kg.

Figura 3. Concentrações de macronutrientes e osmolalidade do LH na linha de base e após adição. Campo Grande, 2020.



DISCUSSÃO

A ultrafiltração do leite humano é pouco referenciada e atualmente é utilizada pela Prolecta Bioscience para produzir Prolact® +4, +6, +8, +10 e RTF 24, 26 e 28, suplementos e fórmulas infantis para prematuros com leite humano exclusivo (Knake et al., 2020; O'Connor et al., 2018). Além do alto custo, há questões éticas e legais que proíbem a comercialização desses produtos no Brasil.

A literatura cita a importância da lactose para o controle da osmolaridade e fornecimento seguro para os RNMBP (Grance et al., 2015), informação que está alinhada com os achados deste estudo, onde a lactose variou de 6,9 ± 0,39 g/dL para 0,92 ± 0,11 g/dL após a remoção por ultrafiltração.

É necessário desnatamento da amostra para favorecer o fluxo de permeação através da membrana no sistema, embora a literatura relacione uma perda de proteína associada. No entanto, a proteína em nosso estudo não foi reduzida, representando na amostra um valor de $0,93 \pm 0,13$ g/dL.

A liofilização é empregada para a concentração de nutrientes na formulação de aditivos homólogos ao leite humano, promovendo a preservação de compostos bioativos e características nutricionais (Grance et al., 2015; Oliveira et al., 2019).

No Brasil, o fortificante comercial mais utilizado é o FM85™ da Nestlé, que contém 0,36 g de proteína bovina parcialmente hidrolisada em 1 g do produto. Esse valor é similar ao encontrado neste estudo, que, considerando o cálculo matemático de proporcionalidade de 0,31g no mesmo peso, destaca que a proteína homóloga foi utilizada para a produção de um concentrado ultrafiltrado de alto valor biológico e com um perfil de aminoácidos adequado e seguro para os RNMBP (Thomaz et al., 2012).

Pesquisas recentes relatam a importância do uso de concentrados de proteína para atender às necessidades dos RNMBP (Dorum et al., 2019). Os dados previamente descritos reforçam a importância dos aditivos proteicos no leite materno em unidades neonatais.

O aumento da quantidade de concentrado proteico no ultrafiltrado para 1,0 g/dL no leite humano garantiu uma ingestão média de proteínas de $2,04 \pm 0,43$ g/dL, tornando possível uma ingestão de proteínas de 3,0 a 3,6 g/kg/dia para uma dieta de leite de 150 a 180 mL/kg/dia. Isso atende à faixa mínima das recomendações da Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica (ESPGAN) (Agostoni et al., 2010), definida como 4,0 a 4,5 g/kg/dia para indivíduos com até 1000 g e 3,5 a 4,0 g/kg/dia para aqueles entre 1000 e 1800 g, e concorda com o estabelecido por Koletzko; Poindexter; Uauy (2014), que recomenda 3,5 a 4,5 g/kg/dia.

Estudos que utilizam aditivos do próprio leite humano são descritos por Grance et al. (2015), com um conteúdo proteico de $2,20 \pm 0,36$ g/dL, e por Oliveira et al. (2019), com um valor proteico de 1,4 g/dL, adicionando um concentrado liofilizado obtido por um método tradicional de secagem para adicionar multinutrientes.

A osmolaridade da nutrição enteral é de interesse substancial para aqueles envolvidos na alimentação dos RNMBP em unidades neonatais, pois, em alta

concentração, está associada a intolerância alimentar e desenvolvimento de enterocolite necrosante (Kreissl et al., 2013). Em geral, os aditivos de leite humano têm uma osmolaridade mais baixa (391-412 mOsm/kg) do que os produtos de leite bovino (431 mOsm/kg), garantindo segurança (Thomaz et al., 2012). Valores acima de 452 mOsm/kg são considerados de risco de acordo com a American Academy of Pediatrics.

Uma alta oferta de proteínas em aditivos de leite humano é o principal elemento de interferência na segurança e osmolaridade (Agostoni et al., 2010). Kreissl et al. (2013) relataram que concentrações de proteínas superiores a 2 g/dL promovem um aumento da osmolaridade acima de 500 mOsm/kg quando utilizados aditivos baseados em multinutrientes e proteína bovina.

Em nossa pesquisa, embora tenha ocorrido um aumento na osmolaridade do leite humano adicionado com o aditivo ultrafiltrado, os valores ficaram entre 265 mOsm/kg e 360 mOsm/kg, próximos ao fisiológico de 338 mOsm/kg, garantindo uma margem de segurança para o uso de suplementos minerais e vitamínicos rotineiramente utilizados em unidades neonatais com o objetivo de corrigir a osmolaridade no lúmen intestinal (Pearson et al., 2013).

O conteúdo de lipídios após a reconstituição do leite ultrafiltrado liofilizado não mudou, justificado pelo desnatamento antes da ultrafiltração. A concentração final de lipídios permaneceu em 2,52 g/dL, o mesmo valor encontrado para o leite humano sem aditivo (Agostoni et al., 2010; Koletzko et al., 2014).

Observou-se também uma diminuição nos sólidos totais no leite humano ultrafiltrado, especialmente no conteúdo de lactose. Isso está de acordo com a literatura que descreve os sólidos totais do leite como os conteúdos de gordura, proteína, lactose, minerais, vitaminas e microelementos, sendo a lactose aproximadamente metade do componente de sólidos não gordurosos do leite (Ribas et al., 2004).

Embora tenha havido uma menor oferta de energia para a cota de consumo diário entre 150 e 180 mL/kg/dia, abaixo da sugerida de 110 a 130 Kcal/kg/dia, a relação proteína/energia foi adequada a 3,4 g/100 Kcal e garante um substrato apropriado para a síntese de novos tecidos nesses bebês (Agostoni et al., 2010).

O conteúdo de carboidratos totais aumentou após a adição, fato justificado por outros estudos e análises químicas, pois mesmo com a remoção da lactose, ainda foram detectados glicose, galactose, oligossacarídeos e glicoproteínas (Ballard; Morrow, 2013).

A determinação de micronutrientes não foi quantificada diretamente porque estava fora do objetivo desse aditivo, apesar de sua importância para a alimentação. O mesmo ocorreu com a análise microbiológica, pois o produto final não seria destinado diretamente à alimentação, mas para testar a metodologia. Para futura aplicação em Bancos de Leite Humano, deve-se seguir os rigorosos padrões de sanitização.

O desnatamento, a remoção de lactose por ultrafiltração e a concentração de proteína por liofilização para subsequente adição ao leite humano, sem mudança substancial no volume, forneceram um aditivo de leite humano com concentração de proteínas compatível com a necessidade nutricional para os RNMBP, além de proporcionar uma osmolaridade dentro do limite tolerável e seguro.

CONCLUSÃO

O processo de ultrafiltração se mostrou eficaz para a remoção de lactose e preservação da proteína do leite humano. O produto ultrafiltrado desenvolvido atingiu concentrações de proteína e lactose adequadas para a alimentação de RNMBP e, após a reconstituição, manteve a osmolaridade dentro do limite seguro.

CONSIDERAÇÕES

A ultrafiltração do leite humano é uma técnica que utiliza pressão e difusão sobre uma membrana semipermeável, o que pode ser muito útil em países em desenvolvimento, tendo em vista a importância de utilizar um aditivo completamente homólogo e seguro na alimentação de recém-nascidos, oferecendo mais calorias e proteínas para o crescimento e um melhor prognóstico para recém-nascidos de muito baixo peso e extremamente baixo peso.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi financiada pelo Instituto de Assistência em Pesquisa e Educação e Saúde - IAPES, Campo Grande, MS, Brasil.

Com apoio experimental do Laboratório de Processos de Separação com Membranas da Universidade Federal de Santa Catarina e Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Conflito de interesse: Os autores não têm conflitos de interesse com a divulgação deste artigo.

347

REFERÊNCIAS

AGOSTONI, C. *et al.* Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, [s.l.], v. 50, n. 01, p. 85-91, jan. 2010. Doi: <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181adaee0>.

BALLARD, O.; MORROW, A.L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatrics Clinics of North America*, [s.l.], v. 60, n. 1, p.49-74, feb. 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, [s.l.], v.72, n. 1, p. 248-254, 7 may 1976. Doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

DORUM, B.A. *et al.* What should be the protein target for adjustable Human Milk fortification in premature infants? *Pakistan Journal of Medical Sciences*, [s.l.], v. 35, n. 1, p. 277-281, jan./feb. 2019. Doi: <https://doi.org/10.12669/pjms.35.1.337>.

GRANCE, T.R.S. *et al.* Homologous human milk supplement for very low birth weight preterm infant feeding. *Revista Paulista de Pediatria*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 28-33, jan./mar. 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rpped.2014.07.001>

HENRIQUES, G.S.; ROSADO, G.P. Formulação de dietas enterais artesanais e determinação da osmolalidade pelo método crioscópico. *Revista de Nutrição*, Campinas, v.12, n.3, p. 225-232, set./dez. 1999. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1415-52731999000300003>

CONCENTRADO PROTEICO DE LEITE HUMANO ULTRAFILTRADO E LIOFILIZADO PARA A ALIMENTAÇÃO DE RECÉM-NASCIDOS DE MUITO BAIXO PESO. Leticia Herter Paper SEVERINO; Adriana Yuriko YAMASAKI; Karla Rejane de Andrade PORTO; Simone Cristina CRUZ; Camila Beatriz de Paula PEREZ; César Augusto SOBRINHO; Melina Gomes Borges; Durval Batista PALHARES D. JNT Facit Business and Technology Journal. QUALIS B1. ISSN: 2526-4281 - FLUXO CONTÍNUO. 2024 - MÊS DE AGOSTO- Ed. 53. VOL. 01. Págs. 335-348. <http://revistas.faculdadefacit.edu.br>. E-mail: jnt@faculdadefacit.edu.br.

KNAKE, L. A. *et al.* Optimizing the use of human milk cream supplement in very preterm infants: growth and cost outcomes. *Nutrition Clinical Practice*, v. 35, n. 4, p. 689-696, aug. 2020. Doi: <https://doi.org/10.1002/ncp.10423>.

KOLETZKO, B.; POINDEXTER, B.; UAUY, R. Recommended nutrient intake levels for stable, fully enterally fed very low birth weight infants. *World Review of Nutrition and Dietetics*, [s.l.], v.110, p.297-299, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1159/000360195>.

KREISSL, A. *et al.* Effect of fortifiers and additional protein on the osmolality of human milk: is it still safe for the premature infant? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, [s.l.], v. 57, n. 4, p. 432-7, oct. 2013. Doi:<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182a208c7>.

O'CONNOR, D.L. *et al.* Nutrient enrichment of human milk with human and bovine milk-based fortifiers for infants born weighing <1250 g: a randomized clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, [s.l.], v. 108, n. 1, p. 108-116, jul. 2018. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy067>. Erratum in: *The American Journal of Clinical Nutrition*, [s.l.], v. 110, n. 2, p. 529, aug. 2019. Erratum in: *The American Journal of Clinical Nutrition*, [s.l.], v. 111, n. 5, p. 1112, may 2020.

OLIVEIRA, M.M. *et al.* Development of a human milk concentrate with human milk lyophilizate for feeding very low birth weight preterm infants: A preclinical experimental study. *PLoS One*, [s.l.], v. 14, n. 2, p. e0210999, 20 feb 2019. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210999>.

PEARSON, F.; JOHNSON, M.J.; LEAF, A.A. Milk osmolality: does it matter? *Archives of disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition*, [s.l.], v. 98, n. 2, p. F166-9, mar. 2013. Doi: <https://doi.org/10.1136/adc.2011.300492>.

RIBAS, N.P. *et al.* Sólidos totais do leite em amostras de tanque nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. *Revista Brasileira Zootecnia* [online], [s.l.], v. 33, n. 6, suppl. 3, p. 2343-2350, dec. 2004. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000900021>.

THOMAZ, D.M. *et al.* Comparison between homologous human milk supplements and a commercial supplement for very low birth weight infants. *Jornal de Pediatria (Rio J)*, Rio de Janeiro, v.88, n. 2, p.119-124, mar./apr. 2012. Doi: <https://doi.org/10.2223/jped.2166>.