



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA E SAÚDE



CAROLINA OLIVEIRA DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO BALANÇO METABÓLICO DE ÁCIDOS
GRAXOS, GORDURA E CÁLCIO EM LACTENTES
ALIMENTADOS COM DIFERENTES FÓRMULAS INFANTIS: UM
ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO, DUPLO-CEGO,
CROSSOVER

TESE DE DOUTORADO

Salvador

2016

Souza, Carolina Oliveira de
Avaliação do balanço metabólico de ácidos graxos,
gordura e cálcio em lactentes alimentados com
diferentes fórmulas infantis: um ensaio clínico
randomizado, duplo-cego, crossover / Carolina Oliveira
de Souza. -- Salvador, 2016.
124 f. : il

Orientador: Hugo da Costa Ribeiro Júnior.
Coorientadora: Janice Izabel Druzian.
Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Saúde) -- Universidade Federal da Bahia,
Faculdade de Medicina, 2016.

1. Ácidos Graxos. 2. Balanço Metabólico. 3. Lactentes.
4. Oleína de Palma. 5. Fórmulas Infantis. I. Júnior, Hugo
da Costa Ribeiro. II. Druzian, Janice Izabel. III.
Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA E SAÚDE



CAROLINA OLIVEIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO BALANÇO METABÓLICO DE ÁCIDOS
GRAXOS, GORDURA E CÁLCIO EM LACTENTES
ALIMENTADOS COM DIFERENTES FÓRMULAS INFANTIS: UM
ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO, DUPLO-CEGO,
CROSSOVER**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Medicina e Saúde.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Hugo da Costa Ribeiro Júnior
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Janice Izabel Druzian

Salvador

2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira

Faculdade de Farmácia – Universidade do Porto, Portugal

Dra. Tereza Cristina Medrado Ribeiro

Hospital Universitário Professor Edgard Santos - Universidade Federal da Bahia

Dra. Ângela Peixoto Mattos

Faculdade de Medicina - Universidade Federal da Bahia

Dr. Ederlan de Souza Ferreira

Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia

Dr. Hugo da Costa Ribeiro Júnior (Suplente)

Escola de Medicina da Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida e por me segurar pelas mãos e fazer meus passos mais firmes.

Às crianças que participaram deste estudo e aos pais que permitiram suas participações, obrigada por acreditarem nos benefícios deste estudo.

Ao meu pai (em memória), que não pode estar presente em minhas conquistas, mas que com certeza sempre estará ao meu lado durante a minha jornada. A minha mãe, por toda confiança, orgulho e principalmente por todo amor. Merecedora da minha admiração e respeito, será para sempre meu maior exemplo de determinação e força. Minha base, meu alicerce, minha vida.

Ao meu esposo Diego, por todo amor prestado ao meu lado desde o início dessa caminhada, por me incentivar, apoiar e entender todas as minhas ausências.

As minhas irmãs Karla e Camila obrigada pelo amor, amizade, carinho, enfim, por fazerem parte da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hugo Ribeiro, pela oportunidade em desempenhar esse belo trabalho, obrigada por acreditar na minha capacidade científica.

A minha coorientadora, Prof^a. Dra Janice I. Druzian, pelos ensinamentos, apoio e pela valiosa orientação prestada desde a graduação e no decorrer de todos esses anos, obrigada pela amizade e incentivo.

À Efigênia Leite e Dra. Tereza Ribeiro, agradeço pelo auxílio prestado nos momentos de dificuldade, obrigada pelo apoio e parceria.

Aos amigos mais do que especiais Jaff, Denilson, Gleice, Lídia, Larissa, Márcio, Jania, Ingrid, Paulo e Augusto. Obrigada pelo companheirismo e amizade. Com a ajuda de vocês tudo se tornou mais fácil.

A toda a equipe LAPESCA, que ajudaram de alguma forma na execução e desenvolvimento dessa tese.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

A todas as pessoas que esperaram e torceram ao meu lado para a conclusão desta etapa e que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização desse trabalho.

Obrigada!!!

“Se, a princípio, a ideia não é absurda, então não há esperança para ela”

Albert Einstein

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”

Albert Einstein

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Lista de Ilustrações e Tabelas..... | 6 |
| Listas de Abreviaturas e Siglas..... | 8 |
| 1 Resumo..... | 9 |
| 2 Abstract..... | 10 |
| 3 Introdução..... | 11 |
| 4 Objetivo..... | 14 |
| 5 Revisão de Literatura..... | 15 |
| 6 Metodologia..... | 32 |
| 6.1 Desenho do estudo..... | 32 |
| 6.2 Sujeitos do estudo..... | 33 |
| 6.3 Critérios de inclusão..... | 33 |
| 6.4 Critérios de exclusão..... | 34 |
| 6.5 Variáveis do estudo e de desfecho..... | 35 |
| 6.6 Fórmulas avaliados no estudo..... | 35 |
| 6.7 Análise das amostras..... | 36 |
| 6.8 Análise dos dados..... | 38 |
| 7 Referências..... | 39 |
| 8 Resultados..... | 50 |
| 8.1 Artigo 1 – Prospecção Tecnológica..... | 51 |
| 8.2 Artigo 2 – Artigo Original..... | 66 |
| 9 Conclusões..... | 97 |
| 10 Considerações finais..... | 98 |
| 11 Limitações e perspectivas do estudo..... | 99 |
| 12 Anexos..... | 85 |
| 12.1 Anexo A – Carta de aceite do artigo original..... | |
| 12.2 Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... | 100 |
| 12.3 Anexo C – Parecer do comitê de ética..... | 97 |
| 12.4 Anexo D – Registro clinical trial..... | 100 |
| 12.5 Anexo E – Planilhas do excel para cálculos..... | 102 |
| 12.6 Anexo F - Cromatogramas amostras e padrão..... | 103 |
| 12.7 Anexo G – Produção científica durante o doutorado 2012-2016..... | 106 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1. Composição centesimal do leite humano.

Tabela 2. Composição essencial para fórmulas infantis.

Figura 1. Representação esquemática da estrutura do triacilglicerol. R₁, R₂ e R₃ indicam ácidos graxos esterificados nas posições sn-1, sn-2 e sn-3, respectivamente.

Prospecção Tecnológica

Tabela 1. Busca de patentes por palavras-chave, agrupamento das palavras e códigos de classificação internacional de patentes na base de dados europeia (Espacenet®).

Figura 1. Distribuição de patentes por códigos da classificação internacional.

Figura 2. Evolução anual do depósito de patentes sobre ácidos graxos em fórmulas infantis na base europeia, entre os anos de 1972 e 2012.

Figura 3. Distribuição de depósitos de patentes por país de origem da tecnologia.

Figura 4. Distribuição de patentes por depositantes na base europeia.

Figura 5. Inventores com maior número de patentes depositadas na base europeia.

Figura 6. Número de patentes depositadas por código de classificação internacional.

Artigo Original - Milk protein-based formulas containing different oils affect fatty acids balance in term infants: a randomized blinded crossover clinical trial

Figure 1. Study flow diagram of the progress through the periods and study subjects' disposition.

Table 1 Approximate composition of study formula products (per 100 g of powder).

Table 2 Study entrance information for subjects.

Table 3 Intake and excretion of fat, fatty acids and calcium of infants fed with PALM and NoPALM formulas.

Table 4 Absorption of fat, fatty acids and calcium of infants fed with PALM and NoPALM formulas.

Figure 2. Correlations between fecal excretions of calcium and fat and C16:0 in studies of formulas. r_s : Spearman correlation coefficient.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|----------------------------------------------------------|
| AG | Ácidos Graxos |
| AGPICL | Ácido Graxo Poli-insaturado de Cadeia Longa |
| ALA | Ácido α -linolênico |
| ARA | Ácido Araquidônico |
| CG-DIC | Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama |
| DHA | Ácido Docosaheptaenóico |
| EPA | Ácido Eicosapentaenóico |
| FAME | Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos |
| FI | Fórmula Infantil |
| LA | Ácido Linoleico |
| LCPUFA | Ácidos Graxos Poli-insaturados de Cadeia Longa |
| LH | Leite Humano |
| NoPALM | Fórmula infantil comercial não contendo oleína de palma |
| PALM | Fórmula infantil comercial contendo oleína de palma |

1. RESUMO

A oleína de palma é usada como fonte de ácido palmítico (C16:0) em fórmulas infantis (FI) para reproduzir o perfil de ácidos graxos (AG) do leite humano. Este estudo, inédito no Brasil, buscou avaliar comparativamente os efeitos de FI comercialmente disponíveis contendo diferentes composições de gorduras, uma com oleína de palma e outra sem oleína, sobre o balanço metabólico de ácidos graxos, gordura e cálcio em crianças a termo saudáveis. Trata-se de um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, do tipo crossover, realizado com 33 lactentes ($68 - 159 \pm 3$ dias de vida) de ambos os sexos, randomizados para alimentação com as fórmulas em estudo por 14 dias (período de tolerância), seguido por um período de balanço metabólico de 4 dias em 17 indivíduos do sexo masculino. A fórmula PALM continha oleína de palma (44%), óleo de palmiste (21,7%), e o óleo de canola (18,5%), enquanto a fórmula NoPALM continha outras fontes de gordura. A absorção de gordura (%) foi maior para alimentação NoPALM (96,55%) do que PALM (95,50%), $p = 0,023$. As porcentagens de absorção de C16:0, não diferiram significativamente entre os grupos ($p > 0,05$), mas este ácido foi excretado em concentrações mais elevadas ($p < 0,05$) na alimentação com a fórmula PALM (29,42 mg/kg/dia) do que NoPALM (12,28 mg/kg/dia). As crianças alimentadas com a fórmula NoPALM apresentaram uma maior porcentagem de absorção DHA e ARA, em função da fonte desses ácidos utilizada. A absorção de cálcio no grupo NoPALM (58,00%) foi maior do que no PALM (40,90%), mas sem diferença significativa ($p = 0,104$), quando a ingestão de cálcio foi usada como covariável. Entretanto, a retenção de cálcio foi maior para alimentação NoPALM com e sem a ingestão de cálcio como covariável. Efeitos adversos não foram significantes ($p > 0,05$). As porcentagens de absorção de AG essenciais e totais foram semelhantes para ambas as fórmulas, mas AG poli-insaturados de cadeia longa foram melhor absorvidos a partir da fórmula NoPALM. Lactentes alimentados com FI contendo oleína de palma apresentaram menores retenções de gordura e de cálcio, demonstrando que diferenças na composição de gordura em FI podem influenciar a absorção de nutrientes.

Palavras-chaves: oleína de palma, óleo de palmiste, balanço metabólico, absorção de nutrientes, lactentes.

2. ABSTRACT

Palm olein is used in infant formula fat blends in order to match the fatty acid profile of human milk. While the effects on fatty acid balance have been evaluated, their use in combination with palm kernel oil and supplementation with docosahexaenoic acid and arachidonic acid has not been similarly assessed in infants. This study, unprecedented in Brazil, evaluated the effects of infant formulas containing different fat compositions on the balance of fat, fatty acids, and calcium. In this randomized, crossover, double-blinded study, 33 healthy term infants ($68 - 159 \pm 3$ days of age at enrollment) were fed two formulas for 14 days in a tolerance period, followed by a 4-day metabolic balance period in 17 of the male subjects. The study compared two commercially available milk-based powdered formulas in Brazil; the PALM formula contained palm olein (44%), kernel palm oil (21.7%), and canola oil (18.5%) as the predominant fats, whereas the NoPALM formula contained other fat sources. Fat absorption (%) was greater in the NoPALM than in the PALM-fed infants (96.55% and 95.50%, respectively; $p = 0.023$). The absorption percentage of palmitic acid (C16:0) did not differ significantly between formulas ($p > 0.05$), but this acid was excreted at significantly higher concentrations in the PALM (29.42 mg/kg/day) than in the NoPALM (12.28 mg/kg/day) formula groups. DHA and ARA absorptions were also higher in NoPALM-fed infants. Calcium absorption was higher in NoPALM-fed infants (58.00%) compared to those fed PALM (40.90%), but the difference was not significant ($p = 0.104$) when calcium intake was used as a covariate. However, calcium retention was higher in NoPALM-fed infants compared to that in PALM-fed infants with or without calcium intake as a covariate. Adverse events did not differ between groups ($p > 0.05$). The absorption of essential fatty acids was similar for both formulas; however, long-chain polyunsaturated fatty acids were better absorbed from the NoPALM formula. Fat absorption and calcium retention were lower in term infants fed the PALM-based formula.

Keywords: Palm olein, kernel palm oil, metabolic balance, absorption of nutrients, infants.

3. INTRODUÇÃO

A alimentação saudável durante o primeiro ano de vida é de fundamental importância, pelo seu impacto na promoção à saúde, no crescimento e desenvolvimento adequado, trazendo repercussões na saúde a longo prazo. Além disso, tem papel relevante na prevenção de doenças crônicas na vida adulta (Robinson et al., 2013).

O aleitamento materno é o melhor alimento para o lactente, sendo capaz de suprir as necessidades nutricionais da maioria das crianças até o sexto mês de vida, com adequado teor de nutrientes que se adapta à evolução do infante (Eidelman et al., 2012).

Nos casos em que seja necessária a complementação ou suplementação do leite materno, quando sua ingestão for inadequada ou as mães não queiram ou não possam amamentar (erros inatos do metabolismo, mães portadoras do HIV ou usuárias de drogas) o recomendável é a substituição e a introdução de alimentação adicional como complementação. No primeiro ano de vida, é contraindicado a utilização de leite de vaca principalmente devido ao maior conteúdo proteico e diferente digestibilidade (Campos, et al., 2008; Hernell, 2011), sendo indicada então, a introdução das fórmulas infantis.

As fórmulas infantis são elaboradas para assemelhar-se o mais próximo possível ao leite materno, a fim de atender às demandas nutricionais dos lactentes conforme regulamentação e preconização do Codex Alimentarius - FAO/OMS (Codex, 2007). Embora não seja possível o desenvolvimento de fórmulas que reproduzam as propriedades imunológicas e a digestibilidade do leite materno, as fórmulas infantis estão passando por muitas modificações, tornando-se uma importante parte do regime alimentar dos lactentes no 1º ano de vida.

Pesquisas para modificações e inovações em fórmulas infantis estão sendo constantemente realizadas como o objetivo de atingir todos os efeitos funcionais que são observados em crianças amamentadas. As pesquisas estão voltadas principalmente para os componentes bioativos presentes no leite humano, destinando-se não necessariamente à similaridade da composição, mas qualitativamente na obtenção do desempenho funcional observado em crianças amamentadas (Alles et al., 2004; Moreno-Villares, 2011; Nguyen et al., 2015). Avanços estão sendo alcançados com a produção de fórmulas adequadas às necessidades específicas do lactente. Exemplos são: acréscimo de nucleotídeos, prebióticos/probióticos e ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, constituem parte dos substitutos do leite materno que são atualmente comercializados (Lönnerdal, 2014; Giovannini, et al., 2014; Foiles, et al., 2016).

Aproximadamente 50% do valor calórico do leite humano é referente ao seu conteúdo lipídico, que é rico em ácido palmítico, oleico e ácidos graxos essenciais. As fórmulas infantis atuais contêm misturas específicas de óleos vegetais projetadas para não somente similar a composição correta de ácidos graxos, mas também a absorção de gordura e ácidos graxos do leite humano. Estudos têm demonstrados que lactentes alimentados com fórmulas contendo diferentes blends de óleos vegetais podem apresentar variações nas absorções de gordura, ácidos graxos e minerais, bem como na tolerância gastrointestinal (Leite et al., 2013). Uma forma de melhorar essa assimilação, é a utilização de misturas de gorduras que mais estreitamente assemelhem-se, composicionalmente e estruturalmente, à gordura do leite humano (Nelson et al., 1998; Koo et al., 2006; Bar-Yoseph et al., 2013; Leite et al., 2013).

O óleo de palma e seu derivado, oleína de palma, são incluídos nas combinações de gorduras da maioria das fórmulas para lactentes. O ácido palmítico é o segundo ácido graxo em concentração no leite humano. Estes óleos, fornecem ácido palmítico para mimetizar a quantidade relativa no leite humano (Koo et al., 2006). No entanto, a distribuição posicional de ácidos graxos individuais nas moléculas de triacilgliceróis de óleos vegetais difere da encontrada nos triacilgliceróis do leite materno, o que afeta as taxas relativas de absorção de ácidos graxos. Ácidos graxos na posição sn-2 são absorvidos como 2-monoacilglicerol e os ácidos graxos nas posições sn-1 e sn-3 são absorvidos como ácidos graxos livres. Em óleos de origem vegetal, inclusive aqueles usados em fórmulas para lactentes, o ácido palmítico está esterificado principalmente nas posições sn-1 e sn-3 (Innis et al., 1994; Bar-Yoseph et al., 2013). Depois da digestão, os ácidos graxos livres relativamente insolúveis conjugam-se com cálcio para formar sabões de cálcio insolúveis, resultando na redução da absorção de cálcio e ácidos graxos (Nelson et al., 1998). No leite humano, o ácido palmítico encontra-se principalmente na posição sn-2 nos triacilgliceróis e são bem absorvidos após a digestão como 2-monoacilglicerol (Innis et al., 1994; Bar-Yoseph et al., 2013).

Vale salientar, que estudos já demonstraram os efeitos da utilização de oleína de palma em fórmulas infantis sobre a absorção de cálcio, gordura e ácidos graxos (Carnielli et al., 1996; Nelson et al., 1998, Ostrom et al., 2002; Koo et al., 2006). No entanto, nenhuma das formulações avaliadas nesses estudos continham além de oleína de palma e óleo de palmiste nas suas composições, associada à adição de ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido araquidônico (ARA) como nutrientes complementares.

Diante do exposto, e visando o maior aproveitamento nutricional de fórmulas infantis utilizadas na alimentação de lactentes, é importante demonstrar o impacto clínico comparativo de fórmulas contendo oleína de palma como principal fonte de gordura,

versus uma fórmula que não contenha oleína, frente à absorção de ácidos graxos, gordura e cálcio em infantes saudáveis.

Dessa forma, esse estudo pretende prover conhecimento e novos dados sobre o efeito e influência da oleína de palma na absorção de cálcio, gordura e ácidos graxos, em lactentes a termo saudáveis alimentados com formulas lácteas em pó à base de leite, suplementadas com DHA e ARA e comercialmente disponíveis no Brasil. Adicionalmente, serão fornecidos pela primeira vez, dados sobre o balanço metabólico desses nutrientes em crianças brasileiras, uma vez que os estudos existentes foram realizados somente nos Estados Unidos e em países da União Europeia.

4. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente o balanço metabólico de duas fórmulas infantis comercialmente disponíveis no Brasil, suplementadas com DHA e ARA, à base de leite em pó, contendo diferentes composições de gordura, uma com oleína de palma como gordura predominante e outra sem oleína, frente à absorção de ácidos graxos, gordura e cálcio em lactentes a termo saudáveis.

5. REVISÃO DE LITERATURA

Leite Humano e Fórmulas Infantis

O leite materno é considerado pela Organização Mundial de Saúde o alimento ideal nos primeiros meses de vida do recém-nascido. Pela sua composição, o leite humano (LH) é um alimento completo e suficiente para suprir as necessidades nutricionais do recém-nascido nos primeiros seis meses de vida (WHO, 2001). Evidências epidemiológicas têm reafirmado a importância do aleitamento materno para a saúde infantil na redução de mortalidade, doenças infecciosas, doenças alérgicas e doenças crônico-degenerativas na idade adulta (Eidelman et al., 2012; Fernández et al., 2013; Ballard e Morrow 2013).

O LH é um fluido extremamente complexo que contém não apenas nutrientes em quantidades ajustadas às necessidades nutricionais e à capacidade digestiva e metabólica da criança, como também fatores protetores e substâncias bioativas que garantem a saúde, o crescimento e o seu desenvolvimento (Fernandes et al., 2013). Sua composição pode variar consideravelmente ao longo do dia e entre diferentes populações. Entre os fatores que podem influenciar sua composição estão: a dieta materna, o tempo de gestação e a duração da lactação (Picciano, 2001; Fernández et al., 2013).

Dentre os principais constituintes do LH estão as proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas, anticorpos, água e elementos traço (Tabela 1). A água está em maior porcentagem (88%) da composição do leite, na qual os íons (sódio, potássio, cloro, cálcio e fosfato) difundem-se livremente. Os lipídios (principalmente triacilgliceróis) constituem cerca de 3 a 5%, as proteínas (principalmente lactalbumina e caseína) 1,5%, os carboidratos (principalmente a lactose) 7% da composição, além de vitaminas e imunoglobulinas (Picciano, 2001; Silva et al., 2007; Ballard e Morrow 2013).

Dos 3 a 5% de lipídios presentes no LH, 98% estão na forma de triacilgliceróis, 1% fosfolipídios e 0,5% de esteróis. Os lipídios apresentam-se na forma de glóbulos em emulsão do tipo óleo em água, que é estabilizada por proteínas (Jensen et al., 1992; Jensen, 1999). Cerca de 50% do valor calórico total do leite humano é proveniente da gordura, que é fonte de vitaminas lipossolúveis, colesterol e ácidos graxos (Jensen, 1999; Kim et al., 2012).

Tabela 1. Composição centesimal do leite humano.

| Nutrientes | Intervalos |
|-------------------------------------|-------------------|
| Energia (kcal) | 48 – 70 |
| Proteínas (g/100mL) | 0,8 – 1,5 |
| caseína | 0,3 |
| α -lactoalbumina | 0,3 |
| Carboidrato (g/100mL) | 6,5 – 9,5 |
| lactose | 5 – 8 |
| Lipídios Totais (g/100mL) | 2 – 4 |
| Principais Ácidos Graxos (%) | |
| 12:0 | 7 – 12 |
| 14:0 | 5 – 11 |
| 16:0 | 14 – 25 |
| 16:1 | 1,5 – 2 |
| 18:0 | 3 – 9 |
| 18:1n9 | 22 – 47 |
| 18:2n-6 | 10 – 20 |
| 18:3n-3 | 0,5 – 1,4 |
| 20:0 | 0,1 – 0,4 |
| 20:4n-6 | 0,06 – 0,6 |
| 20:5n-3 | 0,04 – 0,1 |
| 22:6n-3 | 0,08 – 0,5 |
| Somatório Saturados | 34 – 56 |
| Somatório Insaturados | 45 – 60 |
| Razão n6/n3 | 8 – 11 |
| Minerais (g/100mL) | |
| Cálcio | 0,03 – 0,024 |
| Fósforo | 0,012 – 0,014 |
| Sódio | 0,015 – 0,029 |
| Potássio | 0,013 – 0,055 |
| Vitaminas | |
| A, μ g/L | 68 |
| D, μ g/L | 0,35 – 3 |
| K, μ g/L | 2 – 9 |
| E, mg/dL | 0,34 – 1,4 |

Jensen et al., (1992); Prentice, (1995); Silva et al., (2005); Braga e Palhares, (2007).

Os ácidos graxos no LH são derivados de síntese endógena na glândula mamária e a partir da absorção do plasma materno. Tanto a síntese quanto a disponibilidade advinda do plasma são influenciados pela nutrição materna (Innis, 2014). O LH contém um grande número de ácidos graxos (AG), incluindo saturados, monoinsaturados e poli-insaturados como os da

série n-3 e n-6. Os AG são na maioria de cadeia longa, com quantidades equivalente de ácidos graxos saturados e insaturados. Mais de 200 ácidos graxos foram identificados no leite humano, sendo que seis correspondem a cerca de 90% do total de AG representados pelos ácidos oleico (C18:1), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2 n-6), esteárico (C18:0), mirístico (C14:0) e láurico (C12:0) (Innis, 1992; Jensen, 1999).

Os AG saturados são responsáveis por 34-56% dos ácidos graxos totais do leite humano, sendo 14-25% representado pelo ácido palmítico. Os AG insaturados representam 45-60% do total, sendo o C18:1 seu principal representante (22-47%). Para os AG poli-insaturados (10-25%), a série n-6 se destaca com concentrações variando de 10 a 20% (C18:2) seguida da série n-3 com 0,9-1,8% (Jensen et al., 1992; Silva et al., 2005; Innis, 2014).

A melhor forma de assegurar a oferta de nutrientes para o lactente é através do leite materno, porém, quando a prática da amamentação é impossibilitada, como no caso de alguns erros inatos do metabolismo, filhos de mães portadoras do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e mães usuárias de drogas, o uso de fórmulas infantis (FI) é uma alternativa para a alimentação da criança (Rocha 2008).

As FI para lactentes e para crianças de primeira infância são apresentadas nas formas líquida ou em pó. São produtos utilizados sob prescrição médica ou do nutricionista e, especialmente, fabricados para satisfazer as necessidades nutricionais dos mesmos. As Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) n° 43, 44 e 45, de 19 de setembro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, tratam do regulamento técnico para fórmulas infantis (ANVISA, 2011).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e de acordo com a legislação vigente no País, as FI são atualmente definidas e regulamentadas pelas seguintes Resoluções:

1 - Resolução RDC n. 43/2011- Regulamento Técnico para fórmulas infantis para lactentes:

“Fórmula infantil para lactentes é o produto, em forma líquida ou em pó, utilizado sob prescrição, especialmente fabricado para satisfazer, por si só, as necessidades nutricionais dos lactentes saudáveis durante os primeiros seis meses de vida (5 meses e 29 dias)”.

2 - Resolução RDC n. 44/2011- Regulamento Técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância:

“Fórmula infantil de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância é o produto, em forma líquida ou em pó, utilizado quando indicado, para lactentes sadios a partir do sexto mês de vida até doze meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias) e para crianças de primeira infância sadias (crianças de doze meses até três anos de idade, ou seja, até os 36 meses)”.

3 - Resolução RDC n. 45/2011- Regulamento Técnico para fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas.

“Fórmula infantil para lactentes destinada a necessidades dietoterápicas específicas é aquela cuja composição foi alterada ou especialmente formulada para atender, por si só, às necessidades específicas decorrentes de alterações fisiológicas e/ou doenças temporárias ou permanentes e/ou para a redução de risco de alergias em indivíduos predispostos de lactentes até o sexto mês de vida (5 meses e 29 dias)”.

“Fórmula infantil de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinada a necessidades dietoterápicas específicas é aquela cuja composição foi alterada ou especialmente formulada para atender às necessidades específicas decorrentes de alterações fisiológicas e/ou doenças temporárias ou permanentes e/ou para a redução de risco de alergias em indivíduos predispostos de lactentes a partir do sexto mês de vida até doze meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias) e de crianças de primeira infância”.

A composição do LH serve como referência disponível para as FI. Este, no entanto, contém células vivas, nutrientes essenciais, compostos bioativos, imunoglobulinas e componentes com estruturas moleculares que não podem ser sintetizados artificialmente (Alles et al., 2004). Na impossibilidade do aleitamento materno, a fórmula infantil é indicada por ser modificada para atender às necessidades nutricionais e às condições fisiológicas do lactente no primeiro ano de vida. E considerando que a introdução de outros alimentos na dieta de crianças

com idade inferior a dois anos é cada vez mais precoce, a opção pelas fórmulas infantis é a mais segura (Ballard e Morrow, 2013; Innis, 2014).

Historicamente, foi considerado o leite de diferentes animais (cabra, ovelha e vaca) como alternativas ao leite materno, mas foi o leite de vaca que se destacou como a base da alimentação artificial. No entanto, ao se comparar a constituição do LH com o leite de vaca, há uma gama de diferenças relevantes para o recém-nascido e que podem trazer sérios riscos para sua saúde (Campos et al., 2008).

O leite bovino não é uma fonte adequada de nutrição para neonatos, pois as proteínas do LH são quanti e qualitativamente diferentes. Do conteúdo proteico no LH, 80% é lactoalbumina, enquanto que no leite de vaca essa proporção é de caseína. A baixa concentração de caseína no leite humano resulta na formação de coágulo gástrico mais leve, de fácil digestão e com reduzido tempo de esvaziamento gástrico (Silva et al., 2007). O LH fornece 7 a 16 g de proteína/L a depender do estágio de lactação, enquanto que o leite de vaca 32g/L (Lönnnerdal, 2003; Hernell, 2011), a maior concentração de proteínas no leite de vaca pode ocasionar sobrecarga renal devido à imaturidade destes órgãos nos lactentes (Hamosh, 1996). O LH possui concentrações mais elevadas de AG poli-insaturados de cadeia longa (*ácido* docosahexaenóico e *ácido* araquidônico) e AG essenciais (linoleico e linolênico) fundamentais na síntese de prostaglandinas e para o desenvolvimento cerebral e visual (Lauritzen et al., 2001).

Embora a composição do LH seja um importante parâmetro para a composição das FI, a similaridade não é um indicador de segurança nutricional para os lactentes, pois nas FI, os nutrientes não apresentam a mesma biodisponibilidade do LH. Dessa forma, devem ser usados indicadores de referência, como crescimento ponderal e marcadores biológico, relativos a lactentes saudáveis alimentados exclusivamente com leite materno, para a avaliação (Aggett et al., 2001).

A Tabela 2 apresenta os principais requisitos nutricionais das FI para lactentes de acordo com a ANVISA (2011), que modificou a sua legislação após a atualização da norma *Codex Alimentarius* – Codex Standard for Infant Formula 72-1981 em 2007.

Tabela 2. Composição essencial para fórmulas infantis.

| Composição | Valor mínimo | Valor máximo |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------|
| Energia (kcal) | 60 | 70 |
| Proteína (g/100 kcal) ^a | 1,8 | 3,0 |
| Lipídios (g/100 kcal) | 4,4 | 6,0 |
| C12:0 e C14:0 | Juntos não devem ultrapassar 20% do conteúdo total de AG | |
| <i>trans</i> | Não ultrapassar 3% do conteúdo total de AG | |
| C22:1 | Não ultrapassar 1% do conteúdo total de AG | |
| C18:2n-6 (mg/100 kcal) | 300 | 1400 |
| C18:3n-3 (mg/100 kcal) | 50 | - |
| C18:2n-6:C18:3n-3 | 5:1 | 15:1 |
| Carboidratos (g/100 kcal) | 9 | 14 |
| Lactose (g/100 kcal) | 4,5 | - |
| Vitamina A (µg RE ¹ /100 kcal) | 60 | 180 |
| Vitamina E (mg α-TE ² /100 kcal) | 0,5 | - |
| Vitamina D ₃ (µg/100 kcal) | 1 | 2,5 |
| Vitamina K (µg/100 kcal) | 4 | - |
| Vitamina B ₆ (µg/100 kcal) | 35 | - |
| Vitamina B ₁₂ (µg/100 kcal) | 0,1 | - |
| Vitamina C (mg/100 kcal) | 10 | - |
| Ácido Fólico (µg/100 kcal) | 10 | - |
| Ferro (mg/100 kcal) | 0,45 | - |
| Cálcio (mg/100 kcal) | 50 | - |
| Fósforo (mg/100 kcal) | 25 | - |
| Razão cálcio:fósforo | 1:1 | 2:1 |
| Magnésio (mg/100 kcal) | 5 | - |
| Sódio (mg/100 kcal) | 20 | 60 |
| Potássio (mg/100 kcal) | 60 | 180 |
| Iodo (µg/100 kcal) | 10 | - |
| Selênio (µg/100 kcal) | 1 | - |
| Ingredientes opcionais | | |
| Taurina (mg/100 kcal) | - | 12 |
| Nucleotídeos | Não ultrapassar 5mg/100 kcal | |
| C22:6n-3 (DHA) | Não ultrapassar 0,5% do conteúdo total de gordura | |
| C20:4n-6 (ARA) | Atingir pelo menos a mesma concentração de DHA | |
| C20:5n-3 (EPA) | Não ultrapassar o conteúdo de DHA | |
| FOS e GOS | Não ultrapassar 0,8 g/100 mL em 10% de FOS e 90% de GOS | |

^a O valor mínimo aplica-se à proteína do leite de vaca, para fórmulas com base em proteína isolada de soja, um valor mínimo de 2,25 g / 100 kcal; C12:0 – ácido láurico; C14:0 – ácido mirístico; C22:1 - ácido erúico; C18:2n-6 – ácido linoléico; C18:3n-3 – ácido α-linolênico; ¹ Expresso como retinol equivalente (RE). 1 mcg RE = 3,33 UI Vitamina A = 1 mcg retinol *trans*; ² 1 mg α-TE (alfa-tocoferol equivalente) = 1 mg d-alfa-tocoferol; ³ Calciferol. 1 mcg calciferol = 40 UI vitamina D; C22:6n-3 - ácido docosahexaenóico (DHA); C20:4n-6 – ácido araquidônico (ARA); C20:5n-3 – ácido eicosapentaenoico (EPA); FOS: frutooligossacarídeos; GOS: galactooligossacarídeos.

Modificações Nutricionais em Fórmulas Infantis

As fórmulas para lactentes modificaram-se constantemente nos últimos anos, em virtude de novos conhecimentos sobre nutrientes que devem ser utilizados em maior ou menor quantidade ou acerca de novos componentes a incorporar às fórmulas (Caver, 2003; Campos et

al., 2008). A descoberta de que o leite bovino apresenta maior concentração de proteínas representou um marco e um impulso para o desenvolvimento da alimentação artificial. O conhecimento sobre a composição do leite materno e seus benefícios acelerou o processo de elaboração de fórmulas infantis, principalmente em virtude de pesquisas que comprovaram as limitações das mesmas. Por consequência, estudos sobre novas estratégias para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de FI são continuamente estimulados (Campos et al., 2008).

Atualmente, embora a composição das FI não tenha apresentado grandes mudanças quantitativamente, alterações qualitativas tornaram possível assemelhar-se cada vez mais ao LH (Heird, 2007). No momento, existem várias alternativas para as necessidades especiais de lactentes como: utilização de proteínas hidrolisadas e compostos bioativos, adição de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, nucleotídeos, enriquecimento com minerais, dentre outras (Carver, 2003; Singhal et al., 2010; Lönnerdal, 2014; Uauy e Mena, 2015).

Prebióticos e Probióticos

Prebióticos são elementos nutricionais não digeridos que modificam seletivamente a composição da microbiota preexistente no cólon, estimulando o crescimento e a atividade, naturalmente presentes no LH. Como: oligossacarídeos e componentes contendo frutose e galactose (Epifanio, 2012).

Existem mais de 100 tipos de estruturas de oligossacarídeos presentes no LH, sendo a maioria destes, resistentes à digestão e absorção no intestino delgado, podendo assim, agir como prebióticos no cólon do lactente. Para Roberfroid (2007), somente os fruto-oligossacarídeos e os galacto-oligossacarídeos, dentre os oligossacarídeos, possuem características comprovadamente prebióticas.

Os probióticos são microrganismos vivos, capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. São obtidos por meio de suplemento oral ou produto alimentar que contenha suficiente número de microrganismos, com condições para alterar a microflora do hospedeiro. Os probióticos mais estudados são as espécies de *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* GG), *Bifidobacterium* (*B. Lactis*), *Streptococcus* (*S. thermophilus*), assim como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Epifanio, 2012).

A flora intestinal de lactentes alimentados com LH difere da de lactentes alimentados com FI. A flora intestinal de crianças amamentadas é predominantemente composta de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, enquanto a flora dos lactentes alimentados com fórmula é mais complexa, incluindo também *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* e *Streptococcus*. A diferença ocorre, em parte, devido às altas concentrações de oligossacarídeos presentes no leite humano que estimulam seletivamente bifidobactérias e lactobacilos (Martinez e Ballew, 2011). Estas bactérias são acreditadas como importantes para a absorção de nutrientes, proteção contra a colonização de patógenos e desenvolvimento dos sistemas imune e intestinal. Na tentativa de reproduzir a flora intestinal de lactentes alimentados com LH, prebióticos e probióticos podem ser adicionados às FI com resultados promissores (Campos et al., 2008; Epifanio 2012).

Em um ensaio clínico randomizado com 92 crianças que consumiram fórmulas hipoalergênicas suplementadas com prebióticos ou suplementadas com placebo, o grupo que recebeu os prebióticos apresentou menos episódios de manifestações alérgicas do que o grupo controle. Esta tendência manteve-se ao longo de 5 anos de idade, embora a fórmula suplementada com prebiótico tenha sido suspensa aos 6 meses (Arslanoglu et al., 2012).

Dados científicos disponíveis de uma revisão sistemática da Comissão Europeia de Nutrição, sugerem que a suplementação de FI para crianças saudáveis com probióticos e prebióticos não suscita preocupações de segurança em relação ao crescimento e os efeitos adversos. Mas não há dados suficientes para recomendar o uso rotineiro desses compostos em FI. O Comitê considera que a suplementação de fórmulas com probióticos e/ou prebióticos é um importante campo de pesquisa, havendo a necessidade de condução de novos ensaios clínicos (Braegger et al., 2012).

Nucleotídeos

Os nucleotídeos são compostos químicos de baixa massa molecular (300-350 Da) que são formados pela união de uma pentose, uma base nitrogenada (purina ou pirimidina) e 1 a 3 grupos fosfatos. Quando o grupo fosfato é ausente o composto é conhecido como nucleosídeo e são formados pela combinação da pentose e uma base nitrogenada (Lehninger et al., 1995)

Seres humanos obtêm nucleotídeos por absorção intestinal via dieta ou síntese *de novo*. A síntese *de novo* é metabolicamente dispendiosa, e os nucleotídeos podem ser obtidos de forma

mais eficiente a partir da alimentação ou através da via de recuperação (Caver, 2003). No lúmen intestinal, nucleoproteínas (nucleotídeos ligados a proteínas e ácidos nucleicos) são degradadas por proteases que produzem nucleotídeos livres. Estes são metabolizados por outras enzimas, separando os grupos fosfatos, originando nucleosídeos. Os nucleosídeos podem ser absorvidos pela mucosa intestinal e/ou degradados para formar ácido úrico e/ou convertidos de volta para nucleotídeos via salvamento (Millan, 2005). Essa via é extremamente importante para os tecidos e órgãos cuja síntese de nucleotídeos é deficiente, mas que apresentam uma rápida divisão mitótica, como cérebro, eritrócitos, medula óssea, mucosa intestinal e linfócitos. Os nucleotídeos e seus produtos metabólicos desempenham papéis importantes em muitos processos biológicos, e servem como precursores de ácido nucleico, mediadores fisiológicos, constituintes de coenzimas, e fontes de energia celular. Embora a maioria dos nucleotídeos dietéticos sejam metabolizados e excretados, até 5% são incorporados em tecidos, especialmente durante períodos de crescimento rápido e a ingestão de alimentos limitado (Caver, 2003; Millan, 2005).

Os nucleotídeos representam, aproximadamente, 2-5% de nitrogênio não proteico no LH (30 e 70 mg/L), no entanto, o leite de vaca possui um teor muito menor (504 $\mu\text{mol/L}$) o que influenciou a suplementação de FI com nucleotídeos (Barness, 1994).

Tanto o Comité Científico da União Europeia quanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, consideram que o conteúdo de nucleotídeos adicionados em FI para lactentes não deve exceder 5 mg/100 kcal, sendo a referência o teor do LH, mas vale ressaltar que este é um ingrediente opcional em FI (ANVISA, 2011; EFSA, 2014).

Os nucleotídeos têm sido associados a alguns dos efeitos positivos como ações sobre o sistema imune e sobre o crescimento e reparação de células do trato gastrointestinal, além disso, os nucleotídeos estão ligados a uma menor incidência de diarreia (Brunser et al., 1994; Caver 2003).

Estudos em recém-nascidos indicam que a suplementação com nucleotídeos dietéticos pode proteger contra doenças diarreicas e afetar a velocidade do fluxo sanguíneo nas artérias mesentéricas de crianças após uma refeição (Brunser et al., 1994; Pickering et al., 1998).

Em um ensaio clínico randomizado com 116 lactentes alimentados com leite materno, com fórmula controle e fórmula suplementada com nucleotídeos, foi possível observar que a suplementação com nucleotídeos melhorou a composição da microbiota intestinal dos infantes em relação a fórmula controle, mas sem diferença com o leite materno. A suplementação pode contribuir na redução da incidência de diarreia por promover o crescimento de bifidobactérias (Singhal et al., 2008). No entanto, para Balmer et al. (1994), a suplementação de fórmula com

sais de nucleotídeos não promoveu uma flora fecal próxima a de crianças alimentadas com leite materno, sendo que os resultados não suportaram a adição de nucleotídeos para o reforço da colonização de bifidobactérias na flora intestinal.

Em outro ensaio clínico realizado por Singhal et al. (2010), foi testada a hipótese de que a suplementação com nucleotídeos em FI pode promover um crescimento precoce infantil. Foram avaliadas duas fórmulas, uma suplementada e outra controle em um total de 200 lactentes. Os dados suportaram a hipótese de que a suplementação com nucleotídeos leva a um aumento do ganho de peso e crescimento do perímetro cefálico, mas, os autores sugerem pesquisas adicionais para avaliar essas vantagens no desenvolvimento cognitivo a longo prazo.

O efeito da adição de nucleotídeos sobre o sistema imune foi avaliado com FI a base de soja. A adição de nucleotídeos às formulas não alterou significativamente as populações de células imunes específicas nos indivíduos, mas tendeu a aumentar o número e a percentagem de células T (Cordle et al., 2002).

Para a EFSA (European Food Safety Authority), embora muitos estudos relatem os efeitos benéficos sobre a suplementação de FI com nucleotídeos em função de dados clinicamente relevantes, os resultados não são consistentes e não demonstram os efeitos sobre a incidência ou gravidade de infecções e sobre o crescimento e desenvolvimento infantil. Dessa forma, o Comitê considera que não há necessidade de determinar a adição de nucleotídeos em FI, ficando esse ingrediente como opcional (EFSA, 2014).

Ácidos Graxos Poli-insaturados de Cadeia Longa (LCPUFA)

Alcançar um padrão lipídico similar ao de crianças alimentadas com leite humano é outra meta das fórmulas para lactentes. Uma das dificuldades para se atingir esse objetivo é a grande variabilidade nas taxas de lipídios presentes no leite humano que variam de acordo com a genética, com o estágio de lactação e principalmente com a alimentação (Campos et al., 2008).

Atualmente, considera-se que lactentes requerem uma grande quantidade de ácidos graxos para suprir as suas necessidades metabólicas, bem como a função de vários sistemas. O leite materno provê ao recém-nascido o aporte de LCPUFA necessário para o seu desenvolvimento, de modo que na impossibilidade da utilização, as FI utilizadas como substitutas devem ser semelhantes em concentrações desses ácidos graxos, mas principalmente de seus precursores (Makrides et al., 1995; Innis, 2013).

Dentre os LCPUFAs o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3), o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e o ácido araquidônico (ARA, C20:4n-6) recebem destaque. Nos humanos, estes podem ser obtidos diretamente da dieta, ou por conversão endógena, com sucessivas reações de alongação e dessaturação a partir dos seus precursores – ácidos graxos essenciais – ácido α -linolênico (ALA, C18:3n3) e ácido linoleico (LA, C18:2n6). O ácido α -linolênico é convertido para ácido eicosapentaenoico e, então para DHA, enquanto o ácido linoleico é convertido para ácido araquidônico também por reações enzimáticas, em cadeia (Tinoco et al., 2007; Innis, 2013).

O ARA é o principal o ácido graxo insaturado presente na membrana celular dos músculos do coração, do endotélio vascular, rins, fígado e placenta. O DHA está presente principalmente no cérebro e na retina. O DHA é fundamental para o desenvolvimento desses órgãos no recém-nascido, pois é componente estrutural dos fosfolipídios das membranas celulares, particularmente da fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. DHA está envolvido nas sinapses neuronais, além de estar presente nos fotorreceptores da retina, onde atua na transdução do sinal visual (Auestad et al., 1997; Uauy et al., 2001).

Nos últimos anos a comunidade científica tem debatido sobre a necessidade de adicionar LCPUFA em fórmulas para lactentes. O interesse recebeu destaque após serem publicadas pesquisas demonstrando que os teores de ácidos graxos, principalmente DHA e ARA no conteúdo lipídico de eritrócitos e do plasma de crianças alimentadas com FI, é menor do que crianças amamentadas com leite materno. Uma vez que estes ácidos graxos estão presentes no LH, mas não em FI, o menor teor de ácidos graxos em lactentes alimentados com fórmula foi interpretada como indicativo que as crianças não podem sintetizar suficientemente DHA e ARA para atender às necessidades em curso (Makrides et al., 1995; Auestad et al., 1997).

Era de conhecimento, que os lactentes obtinham DHA e ARA a partir da metabolização de ALA e LA. No entanto, estudos baseados em exames pós-morte de crianças alimentadas com leite materno e com FI, demonstrou que infantes amamentados possuíam maior concentração de DHA no córtex cerebral do que os alimentados com FI. Além disso, os autores observaram que as concentrações de DHA no cérebro de crianças amamentadas aumentaram durante a infância, mas permaneceram constantes nas que utilizaram as FI, sugerindo que sem uma fonte dietética de DHA, a criança não é capaz de atender às necessidades de seu cérebro em rápido desenvolvimento (Makrides et al., 1994).

Atualmente, a suplementação de FI para lactentes com DHA e ARA apresenta-se controversa, e as constatações não mostram consistências. Muitos estudos demonstraram maiores pontuações cognitivas, desenvolvimento mental e acuidade visual em crianças que

utilizam FI contendo DHA e/ou ARA (Uauy et al., 2003; Birch et al., 2010; Drover et al., 2011; Willatts et al., 2013). Porém, em 2008 duas metanálises realizadas pela Colaboração Cochrane com estudos randomizados e controlados demonstraram que leites suplementados LCPUFA não favoreceram o crescimento, a acuidade visual, ou neurodesenvolvimento em prematuros ou infantes a termo, o que colocou a utilização desses em questão (Schulzke et al., 2008; Simmer et al., 2008). Essa afirmação foi reafirmada em outra metanálise realizada pela mesma organização em 2011 (Simmer et al., 2011) e diferentes autores, também afirmam não existir evidências que a suplementação de FI com LCPUFA influencia no desenvolvimento infantil (Makrides et al., 2005; Beyerlein, 2010; Qawasmi et al., 2012). No entanto, vale salientar que outros ensaios estão associando a utilização de concentrações mais baixas de DHA e pelo menos igual conteúdo de ARA a efeitos benéficos, entretanto, mais estudos são necessários para definir melhor os benefícios e as doses necessárias para a suplementação (Birch et al., 2010; Colombo et al., 2011).

Devido às incertezas sobre a eficácia da suplementação de DHA e ARA em FI, nenhum grupo de especialistas determina a adição desses ácidos graxos como obrigatória, sendo esses, ingredientes opcionais em fórmulas para lactentes e crianças de primeira infância. De acordo com a ANVISA, (2011) e o *Codex Alimentarius*, (2015) o limite máximo de DHA a ser adicionado em FI não deve ser superior à 0,5% do conteúdo total de ácidos graxos, e o ARA deve atingir pelo menos as mesmas concentrações do DHA.

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos concluiu a partir de uma revisão da literatura que, apesar do DHA ser necessário para a adição em FI, a adição de ARA é dispensável, mesmo na presença de DHA (EFSA, 2014). No entanto, Crawford et al. (2015) discordam e comentam sobre as recomendações em torno da necessidade e importância da adição de ARA em fórmulas infantis. Os autores recomendam uma reavaliação da opinião científica pelo Comitê devido às limitações dos estudos avaliados.

Metabolismo de Lipídios

O leite materno é elaborado para fornecer uma alimentação perfeitamente equilibrada a fim de atender às necessidades da criança nos primeiros meses após o nascimento, sendo 50% da energia do LH fornecida por ácidos graxos (Innis, 1992).

Os ácidos graxos no LH tem distribuição posicional característica, e esta configuração tem sido sugerida como a principal causa da eficiência da absorção de lipídios do leite materno. Cerca de 98% dos lipídios do LH estão na forma de triacilgliceróis, na qual os ácidos graxos saturados e insaturados estão esterificados na molécula de glicerol em posições estereoespecíficas sn-1, sn-2 e sn-3 (Figura 1) (Innis, 1992, Jensen et al., 1992). Embora o LH contenha pelo menos 170 diferentes estruturas de triacilgliceróis, apenas 30 delas representam 70% do total da gordura. As estruturas dos triacilgliceróis no leite materno favorecida pela hidrólise é a formada por ácidos graxos saturado (C16:0) esterificados na posição sn-1, ácidos graxos monoinsaturados (C18:1) na posição sn-2, e insaturado (C18:1n-9 e C18:2n-6) na posição sn-3 (Winter et al., 1993).

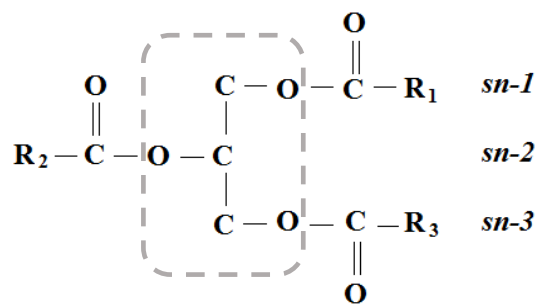


Figura 1. Representação esquemática da estrutura do triacilglicerol. R₁, R₂ e R₃ indicam ácidos graxos esterificados nas posições sn-1, sn-2 e sn-3 respectivamente.

O processo de digestão e absorção de lipídios é complexo, inicia-se no estômago, passando pelo intestino delgado, onde a digestão é completada e ocorre a absorção. No estômago, a digestão acontece por ação enzimática das lipases lingual e gástrica. A lipase lingual atua sobre os triacilgliceróis hidrolisando as ligações ésteres dos ácidos graxos na posição sn-3 da molécula de glicerol. A lipase gástrica também atua no processo de digestão dos lipídios, essa enzima é produzida na mucosa gástrica e apresenta características semelhantes àquelas da lipase lingual. Ambas as lipases atuam sobre triacilgliceróis, preferencialmente na posição sn-3, resultando como produto da hidrólise diacilgliceróis e ácidos graxos livres. Essas enzimas desempenham um papel importante na digestão das gorduras do leite em recém-nascidos, nos quais o sistema da lipase pancreática ainda não está totalmente desenvolvido (Innis, 1994; Oliveira et al., 2002). A lipólise gástrica inicial de triacilgliceróis é crucial para o processo digestivo, especialmente em crianças com função pancreática imatura e baixa concentração de sais biliares, pois os produtos finais servem como agentes emulsionantes para a fase de digestão intestinal (Lien, 1994).

Após a passagem dos triacilgliceróis parcialmente digeridos para o duodeno, micelas mistas são formadas e a lipase pancreática colipase-dependente prossegue com lipólise subsequente (Oliveira et al., 2002; Lien, 1994). A lipase pancreática hidrolisa ácidos graxos nas posições sn-1 e sn-3, enquanto que a posição sn-2 é relativamente resistente à sua atividade (Rogalska et al., 1990). Quando a atividade da lipase pancreática no intestino é adequada, os resultados finais da digestão de gorduras são ácidos graxos livres e 2-monoacilglicerol, este último, subsequentemente cria micelas com ácidos biliares, sendo absorvido rapidamente, independente do ácido graxo constituinte da estrutura. Em contraste, nem todos os ácidos graxos livres são facilmente absorvidos, ácidos graxos saturados de cadeia mais longa (C16:0 e C18:0) são geralmente menos bem absorvidos do que os de cadeia média (C6:0 C10:0) e ácidos graxos insaturados. A diminuição da absorção com o aumento da cadeia está relacionada à formação de complexos insolúveis (Innis, 1992; Bracco 1994). Dessa forma, a absorção de gordura é altamente influenciada pela posição dos ácidos graxos individuais na molécula do triacilglicerol, por isso, somente simular o perfil de ácidos graxos do LH nas FI não é suficiente para promover uma absorção eficiente.

Nas FI, combinações de óleos vegetais são usadas para simular, pelo menos parcialmente, o perfil de ácidos graxos do LH, com o intuito de proporcionar a boa absorção resultante da alimentação com leite materno. Atualmente, as fórmulas para lactentes são constituídas por misturas de óleos vegetais como: coco, excelente fonte de ácido graxo saturado de cadeia curta (C12:0 e C14:0); soja e canola, fonte de ácidos graxos poli-insaturados (C18:2n-6 e C18:3n3), cártamo e girassol, fonte de ácidos graxos monoinsaturados (C18:1n-9) e palma, fonte de ácido palmítico. No entanto, além da ausência de LCPUFAs, esses óleos diferem consideravelmente no perfil de ácidos graxos e nas posições estereoespecíficas na molécula do triacilglicerol (Jensen et al., 1992).

Nos triacilgliceróis do LH maduro, o ácido palmítico (C16:0) é o ácido graxo saturado predominante, constituindo 14-25% dos ácidos graxos, sendo 70-75% esterificado na posição sn-2 (Winter et al., 1993; Innis et al., 1994). O ácido graxo insaturado majoritário é o ácido oleico (C18:1n-9), e este está preferencialmente esterificado na posição sn-1 e sn-3, resultando como principal triacilglicerol a estrutura 18:1n-9 – 16:0 – 18:1n9, que representa 11,8% do total de triacilgliceróis do leite materno (Innis et al., 1994; Innis 2011).

Em contraste com a gordura do LH, em que o ácido palmítico (C16:0) é esterificado predominantemente na posição sn-2, em óleos vegetais utilizados na produção de fórmulas para lactentes, o ácido palmítico é esterificado principalmente nas posições sn-1 e sn-3. Esse ácido na posição sn-2 no LH, geralmente não é hidrolisado pela lipase pancreática, pois está tende a

hidrolisar seletivamente ácidos graxos na posição sn-1 e sn-3, dessa maneira, o C16:0 é bem absorvido como 2-palmitoil-glicerol, pois forma micelas com os sais biliares, impedindo assim, a sua interação com cátions bivalentes reativos (Rogalska et al., 1990; Innis et al., 1994; Innis, 2011; Bar-Yoseph et al., 2013). No entanto, em óleos vegetais, o C16:0 está esterificado preferencialmente nas posições sn-1 e sn-3, o que favorece a hidrólise pela lipase pancreática, produzindo assim ácido palmítico livre (não ligado ao glicerol). Na forma de ácido graxos livre, no lúmen intestinal, o C16:0 apresenta baixa solubilidade, podendo reagir com os íons cálcio formando complexos. Estes complexos, são conhecidos como sabões de cálcio, e caracterizam por serem insolúveis e facilmente excretados nas fezes, promovendo assim, baixa absorção de gordura e cálcio, além de mudança na consistência fecal (Innis et al., 1994; López-López et al., 2001).

López-López et al. (2001) avaliaram durante 2 meses 36 lactentes alimentados com leite materno e fórmulas contendo baixo e altos teores de ácido palmítico na posição sn-2. Após o período do estudo, os autores encontraram menores concentrações de ácido palmítico e cálcio em fezes de crianças alimentadas com leite materno e FI com alta concentração de C16:0 em sn-2, concluindo assim, que o posicionamento do ácido palmítico em sn-2 pode melhorar a absorção de gordura e cálcio em lactentes. Resultados semelhantes foram descritos por Carnielli et al. (1996) em um ensaio clínico randomizado com 3 fórmulas infantis contendo diferentes concentrações de C16:0 em sn-2. Os autores concluíram que uma dieta rica em triacilgliceróis contendo ácido palmítico na β -posição (sn-2), como no leite materno, tem efeitos benéficos significativos sobre a absorção intestinal de cálcio, gordura e ácidos graxos em lactentes a termo. Em adição, outros autores também afirmam que a presença de C16:0 em sn-2, reduz a formação de sabões de cálcio, produzindo conseqüentemente fezes mais moles e menor constipação em crianças a termo (Bongers et al., 2007; Leite et al., 2013; Nowacki et al., 2014).

Óleo de Palma e Oleína de Palma

O óleo de palma contribui significativamente para o mercado global de óleos e gorduras, com a produção mundial anual superior a 50 milhões de toneladas. Cerca de 85% do óleo de palma produzido é utilizado na indústria de alimentos (ABRAPALMA, 2016). Isso fez com que ao longo das últimas três décadas as propriedades nutricionais do óleo de palma e suas respectivas frações fossem devidamente comprovadas através de investigação.

O óleo de palma é produzido a partir da polpa do fruto da palmeira conhecida como Dendezeiro (*Elaeis guineensis*). Este óleo contém como principais ácidos graxos o ácido palmítico (45%), oleico (40%), linoleico (10%) e esteárico (5%). No entanto, essa composição é diferente nos produtos obtidos a partir desse fruto. A oleína de palma é obtida por fracionamento ou refino natural do óleo de palma, esta contém aproximadamente 48% de ácido oleico, 35% de palmítico e 11% de linoleico. Já o óleo de palmiste é obtido a partir da semente do fruto da palma, é possui como principais ácidos graxos o ácido láurico (46%), oléico (17%), mirístico (16%) e palmítico (10%) (D'Agostini e Gioielli, 2002).

A oleína de palma tem sido amplamente utilizada em misturas de óleos vegetais para aplicação em alimentos, pois trata-se de uma fonte barata de ácido palmítico. Fabricantes tem adicionado oleína de palma em fórmulas infantis para simular o alto conteúdo de ácido palmítico do leite materno, sendo que fórmulas elaboradas com esse óleo apresentam 22-25% de ácido palmítico em comparação com 8-10% em fórmulas sem oleína. No entanto, a distribuição posicional do ácido palmítico na oleína (preferencialmente sn-1 e sn-3) faz com que esse seja absorvido na forma de ácido graxo livre, que tende a se complexar com o cálcio, reduzindo assim, a absorção desse mineral e de gordura (Nelson et al., 1996; Nelson et al., 1998; Koo et al., 2006).

Nelson et al., (1996 e 1998) em dois ensaios clínicos randomizados conduzidos com lactentes saudáveis, relataram significativamente menor absorção de gordura e cálcio nas crianças alimentadas com FI contendo 53% ou 45% de oleína de palma como gordura predominante, em comparação com crianças alimentadas com fórmulas similares, mas sem oleína de palma. Carnielli et al. (1996) afirmam que isso ocorre devido ao posicionamento do ácido palmítico no triacilglicerol.

Para Koo et al. (2003) uma consequência fisiológica importante na redução da biodisponibilidade do cálcio, seria um efeito negativo sobre o desenvolvimento do esqueleto da criança. Dessa forma, os autores avaliaram se a alimentação de lactentes com FI contendo oleína de palma durante 6 meses, resultaria em diminuição do conteúdo mineral ósseo e da densidade mineral óssea, em comparação com fórmulas sem oleína. Os autores afirmaram que a inclusão de oleína de palma em FI, reduz a mineralização óssea, pois lactentes a termo saudáveis que utilizaram FI contendo oleína de palma como gordura predominante, tiveram significativamente menor valor para a densidade mineral óssea. No entanto, Young et al. (2005) recrutaram crianças saudáveis com 4 anos de idade que se alimentaram de formulas infantis durante os primeiros meses de vida (dados de prontuário). Das 178 crianças avaliadas, 57 tinham consumido leite materno, 56 - fórmula sem oleína e 65 - fórmula com oleína, durante

os primeiros 4 meses de vida. Através da análise dos resultados, foi possível concluir que em comparação com o leite materno, fórmulas com e sem oleína não influenciaram no conteúdo e na densidade mineral óssea. Mas, uma revisão sistemática da literatura demonstrou que o uso de oleína de palma em FI tem consequências fisiológicas indesejáveis (menor massa óssea e baixa absorção de cálcio, gordura e ácido palmítico) indicando que a substituição de oleína em FI para evitar os efeitos indesejáveis (Koo et al., 2006).

Além disso, estudos relatam uma elevação na formação de fezes duras contendo sabões de cálcio em lactentes alimentados com a fórmula contendo oleína como óleo predominante em comparação a lactentes alimentados com fórmulas semelhantes sem oleína ou leite humano (Carnielli et al., 1996; Lucas et al., 1997). Foram relatadas também fezes mais duras em lactentes anteriormente amamentados com leite materno que mudaram para uma fórmula contendo oleína de palma, bem como aqueles alimentados com tais fórmulas desde o nascimento em comparação a lactentes semelhantes alimentados com fórmula sem oleína (Lloyd et al., 1999).

6. METODOLOGIA

6.1 Desenho do estudo

Este foi um ensaio clínico randomizado, controlado, duplo-cego, de balanço metabólico cruzado. O estudo foi conduzido em dois períodos idênticos (I e II). Cada período foi composto de uma fase de tolerância com duração de 14 dias, e uma fase de balanço metabólico com duração de 04 dias (Leite et al., 2013).

No Período I, lactentes a termo saudáveis do sexo masculino e feminino que atenderam os critérios de inclusão foram randomizados para uma das duas fórmulas em estudo, sendo a randomização gerada por computador usando-se um algoritmo de blocos permutado pseudo-aleatório. Neste período (I), inicialmente os lactentes foram alimentados por 14 dias para avaliação da tolerância gastrointestinal. Após completar os 14 dias, apenas os meninos foram direcionados para realizar a fase de balanço metabólico durante 04 dias. Posteriormente a conclusão do Período I, os lactentes do sexo masculino foram então transferidos para a outra fórmula em estudo (Período II) e alimentado por mais 14 dias para avaliação da tolerância e por 4 dias extras para avaliação de balanço metabólico.

A fase de tolerância compreendeu um período em que as crianças foram monitoradas durante sua permanência na Creche do ponto de vista de ingestão das fórmulas do estudo, consumo de leite materno, dados antropométricos, de saúde e tolerância gastrointestinal, através de registros realizados por uma equipe treinada composto por nutricionistas, médicas e estagiárias. Durante a semana, os participantes foram alimentados na Creche exclusivamente com as fórmulas em estudo a eles designadas. À noite, durante os finais de semana e feriados, os pais foram responsáveis pela alimentação com as fórmulas, sendo permitida a suplementação com leite materno (peso da criança registrado antes e após a alimentação).

A fase de balanço metabólico compreendeu um período de 04 dias de permanência das crianças (do sexo masculino), acompanhados de suas genitoras, em enfermaria de balanço metabólico no Centro de Pesquisa Fima Lifshitz, Salvador-BA. Esta enfermaria foi devidamente preparada e equipada para favorecer a observação e coletas adequadas de amostras de fezes e urina separadas, além de registro de toda a evolução clínica, dietética e antropométrica das crianças. Durante a fase metabólica os lactentes foram alimentados exclusivamente com as fórmulas, não sendo permitida a suplementação com leite materno.

A avaliação de ingestão durante cada período de balanço começou com a primeira alimentação, após a alimentação com o corante comestível azul brilhante, utilizado como marcador (Fomon, 1993; Ostrom et al., 2002), até a última alimentação adicionada do corante. A primeira alimentação contendo o marcador (56 mL) não foi incluída ao se calcular a ingestão da fórmula durante o período de balanço, mas a última foi considerada. Para determinar a ingestão da fórmula, as mamadeiras foram pesadas imediatamente antes e depois de cada alimentação usando uma Balança Ohaus Modelo CT600 (Florham, New Jersey). As perdas por regurgitação e vômito foram medidas usando-se fraldas e panos pesados previamente. Os lactentes foram pesados todos os dias usando uma Balança Pediátrica SECA (intervalos de 10 gramas). Durante o período de balanço metabólico as amostras de fezes e urina foram coletadas separadamente e um pool diário foi armazenado a -60 °C antes das análises.

Este estudo foi registrado no Clinical Trials (www.clinicaltrials.gov) sob o número NCT0094564, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas (CEP 042/09) da Maternidade Climério de Oliveira - UFBA e conduzido de acordo com os princípios éticos contidos na Declaração de Helsinki com duração de 06 meses.

6.2 Sujeitos do estudo

Foram recrutados um total de 34 lactentes a termo saudáveis, com idade entre 68 – 159 ± 03 dias, de ambos os sexos. Destes, 33 concluíram a fase de tolerância, sendo que 1 lactente foi retirado precocemente por ter apresentado problema de saúde, não relacionado ao estudo. Dos 33 sujeitos, apenas 17 meninos participaram das fases de balanço metabólico.

6.3 Critérios de inclusão

Foram selecionados para fazer parte deste estudo, lactentes que atenderam os seguintes requisitos:

- Lactente com boa saúde, conforme determinado pelo seu histórico médico relatado pelo(s) pai(s) à equipe de investigadores;

- Lactente nascido de parto único, a termo completo, com idade gestacional de 37 – 42 semanas de acordo com o relato dos pais;
- Lactente tendo entre $68 - 159 \pm 3$ dias de idade na inclusão;
- Pai(s) que confirmaram sua intenção de alimentar o lactente exclusivamente com a fórmula em estudo designada pelo menos durante a fase metabólica do estudo. Suplementação ocasional com leite materno em casa (fora da creche) durante a fase de tolerância do estudo foi permitida quando o(s) pai(s) concordou em pesar o bebê antes e depois das amamentações com leite materno;
- Pai(s) que confirmaram sua intenção de não administrar suplementos vitamínicos ou minerais, alimentos sólidos ou sucos a seus bebês no decorrer do estudo, salvo se instruído de outra forma por profissional de saúde;
- Pai(s) dos lactentes ou um responsável legal que assinaram e dataram voluntariamente um termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e fornecido regulamentação/ autorização de privacidade aplicável no Brasil antes de qualquer participação no estudo.

Critérios adicionais foram estabelecidos para que os lactentes fossem encaminhados para a fase metabólica do estudo:

- Lactente do sexo masculino que concluiu com êxito a fase de tolerância do estudo. (Pela dificuldade de separação entre fezes e urina em crianças do sexo feminino);
- Lactente do sexo masculino que continuou a alimentar-se com a fórmula em estudo designada como fonte de nutrição principal com uma ingestão mínima de 65 kcal/kg.

6.4 Critérios de exclusão

- Histórico médico adverso da mãe, do feto, ou do lactente que o investigador acreditou ter potencial para afetar a tolerância, crescimento e/ou desenvolvimento. Isto incluiu, entre outros, suspeita de abuso de substância por parte da mãe;
- Lactentes que haviam sido tratados com antibióticos 03 dias antes da inclusão no estudo;
- Lactentes que haviam recebido produtos contendo probióticos 03 dias antes da inclusão no estudo;

- Lactentes que estivessem usando medicações ou remédios caseiros (como Luftal® para gases ou suco para constipação), preparados fitoterápicos, probióticos ou líquidos de reidratação/intravenosos que pudessem afetar a tolerância gastrointestinal não foram incluídos, a menos que os pais e o médico concordassem com a possibilidade de descontinuar o uso destes agentes antes da inclusão.

Critérios de Exclusão Adicionais para a Fase de Balanço Metabólico do Estudo:

- Lactente do sexo masculino que tivesse sido tratado com antibióticos 03 dias imediatamente antes de qualquer uma das duas avaliações de balanço metabólico de 04 dias;
- Lactente do sexo masculino que tivesse recebido suplementos vitamínicos ou minerais ou produtos contendo probióticos 03 dias imediatamente antes de qualquer uma das duas avaliações de balanço metabólico de 04 dias.

6.5 Variáveis do estudo e de desfecho

A variável primária do estudo foi a absorção de cálcio, calculada a partir da diferença entre a ingestão de cálcio e excreção fecal e urinária de cálcio, mensurada durante os períodos de estudo balanço metabólico. As variáveis secundárias incluíram a retenção de cálcio, absorção de gordura, e absorção individual de ácidos graxos. As variáveis demográficas foram idade gestacional, dados antropométricos de nascimento (peso e comprimento) e idade no primeiro dia do estudo. Todos os eventos adversos e eventos adversos graves, que ocorreram após o consentimento assinado até a saída do estudo foram avaliados como variáveis de segurança.

6.6 Fórmulas avaliadas no estudo

A fórmula láctea infantil controle deste estudo foi um leite em pó comercialmente disponível no Brasil contendo oleína de palma como fonte predominante de gordura (Nan1 Pró® da Nestlé), designada nesse trabalho como PALM fórmula. Esta possui uma mistura de gorduras que compreende 44% de oleína de palma, 21,7% óleo de palmiste, 18,5 % de canola,

e outros óleos em menor teor. A outra fórmula láctea infantil (Similac Advance® da Abbott), designada como NoPALM fórmula, também comercialmente disponível no país, não continha oleína de palma em sua composição, sendo composta por 42% de óleo de girassol com alto teor de ácido oléico, 30% de óleo de coco e 28% de óleo de soja. Ambas as fórmulas do estudo continham DHA e ARA e cumpriam as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil conforme regulamentações da Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA) e do Codex Alimentarius. As fórmulas possuem níveis de nutrientes de acordo com as recomendações da Academia Americana de Pediatria, Comitê de Nutrição (1988), nos termos definidos pela Lei de Fórmulas Infantis de 1980, posteriormente alterada (1986).

6.7 Análise das amostras

Os lipídios totais das fórmulas infantis e das fezes coletadas foram extraídos por método a frio utilizando clorofórmio/metanol (2:1) conforme metodologia proposta por Folch, (1957), sendo as extrações realizadas em duplicata.

Os ácidos graxos individuais foram determinados por cromatografia gasosa. Para isso, uma alíquota dos lipídios totais (aproximadamente 25 mg) foi submetida à reação de saponificação com NaOH em metanol, seguida de metilação com catalisador BF₃ (12% em metanol). Os metil ésteres de ácidos graxos foram extraídos com isooctano e transferidos para frasco âmbar contendo 1mg de padrão interno (C23:0 - T9900; Sigma Aldrich®) e armazenados em atmosfera inerte (N₂) em freezer -60°C.

A separação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo a gás (Varian 3800) equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida DB-FFAP (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm). Os parâmetros de análises foram: temperatura do injetor 250 °C; temperatura do detector 280 °C; temperatura da coluna programada a 150 °C 16 min., 2 °C por min. até 180 °C; permanecendo nessa temperatura por 25 minutos e aumentando 5 °C até 210 °C; e permanecendo por 25 minutos. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste a 1,0 mL/min. Foi utilizado nitrogênio como gás *make up* a 30 mL/min.; fluxo do gás hidrogênio a 30 mL/min.; ar sintético a 300 mL/min. As injeções foram realizadas em duplicatas e o volume de injeção foi de 1µL.

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os tempos de retenção do padrão mix (189-19,

Sigma, EUA). Como parâmetro de identificação conclusiva dos ácidos graxos, as amostras foram injetadas em um Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (Clarus 500, Perkin Elmer). Os fragmentos de massa das amostras foram comparados com os dados espectrais da biblioteca NIST (do equipamento) e padrão mix, nas mesmas condições empregadas na análise por CG-DIC, num espectro de 45-600 m/z (IE, 70eV). A quantificação dos ácidos graxos foi realizada de acordo com a equação 1 e expressa em miligramas de ácidos graxos por grama de lipídios.

$$\text{Concentração (mg/g)} = \frac{A_{AG} \times M_{PI} \times F}{A_{PI} \times M \times F_{AG}} \times 1000 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

A_{AG} = área do pico do éster metílico de ácido graxo no cromatograma da amostra; M_{PI} = massa do padrão interno adicionada à amostra em mg; F = fator de correção de resposta de cada éster metílico de ácido graxos no detector de ionização em relação ao C23:0; A_{PI} = área do padrão interno no cromatograma da amostra; M = massa da amostra em miligramas; F_{AG} = fator de conversão de éster metílico de ácido graxos para ácido graxo.

Para a análise de cálcio, amostras das fórmulas em estudo e fezes coletadas, foram desidratadas em estufa com circulação de ar (Nova Ética 440D1). Em seguida, foi adicionado às amostras solução de ácido tricloroacético 5%, com posterior agitação em vortex (30 segundos) e centrifugação (14.000 rpm/5min.), para separação da fase sólida remanescente. O sobrenadante foi então diluído com solução de Lantânio 1,0 g/L, um agente que se liga ao fosfato, liberando o cálcio, promovendo dessa forma o aumento do sinal da absorbância. As amostras foram então analisadas em um espectrofotômetro de absorção atômica (Modelo 55B; Varian Medical Systems) nas seguintes condições de análise: Lâmpada de cátodo-oco para cálcio ($\lambda = 422,7$ nm), corrente da lâmpada de 10mA, estequiometria da chama: redutora; cone vermelho de 1 a 1,5cm de altura, largura da fenda de 0,5nm, fluxo de gás combustível acetileno de 1,5 L/min. e ar sintético como gás de suporte. As amostras de urina foram diretamente analisadas utilizando o mesmo equipamento nas mesmas condições, porém, sem tratamento ácido prévio. A quantificação foi feita através da construção de uma curva analítica a partir de uma solução padrão estoque de cálcio 1000mg/L (Merck®) nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L (Leite et al., 2013). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

6.8 Análise dos dados

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software STATA 12 (StataCorp, College Station). A interação entre fórmula e período do estudo (efeito *carryover*) foi usado para analisar os resultados de equilíbrio metabólico por meio de análise de variância (ANOVA). Quando o efeito *carryover* foi significativo ($p < 0,10$), somente os resultados do Período I foram utilizados. O teste não paramétrico de Wilcoxon Rank Sum foi empregado para testar a hipótese de igualdade das medições observadas, com o nível de significância estatística $p < 0,05$. Correlações parciais foram determinadas por modelos lineares gerais após o ajuste para a fórmula usando o software IBM SPSS Statistics, versão 20.0 (IBM Corp.). Análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada na avaliação da absorção de nutrientes (cálcio, gordura, ácidos graxos individuais) uma vez que existissem diferenças significativas na ingestão dos mesmos; a ingestão de nutrientes foi utilizada como covariável.

7. REFERÊNCIAS

ABRAPALMA, Associação Brasileira de Produtores de Óleo de Palma. Disponível em:<
<http://www.abrapalma.org/pt/>>, acessado em: 07 de abril de 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (2011). Resolução RDC n. ° 43 de 19 de setembro de 2011. Regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes. *Diário Oficial da União*.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (2011). Resolução RDC n. ° 44 de 19 de setembro de 2011. Regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância. *Diário Oficial da União*.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (2011). Resolução RDC n. ° 45 de 19 de setembro de 2011. Regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas. *Diário Oficial da União*.

Aggett, P. J., Agostini, C., Goulet, O., Hernell, O., Koletzko, B., Lafeber, H. L., Weaver, L. T. (2001). The nutritional and safety assessment of breast milk substitutes and other dietary products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 32(3), 256-258.

Alles, M. S., Scholtens, P. A., Bindels, J. G. (2004). Current trends in the composition of infant milk formulas. *Current Pediatrics*, 14(1), 51-63.

Arslanoglu, S., Moro, G. E., Boehm, G., Wienz, F., Stahl, B., Bertino, E. (2012). Early neutral prebiotic oligosaccharide supplementation reduces the incidence of some allergic manifestations in the first 5 years of life. *Special Issue: Early Nutrition and Outcomes in Preterm and Term Infants*, 26(3), 49.

Auestad, N., Montalto, M. B., Hall, R. T., Fitzgerald, K. M., Wheller, R. E., Connor, W. E., Hartmann, E. E. (1997). Visual acuity, erythrocyte fatty acid composition, and growth in term infants fed formulas with long chain polyunsaturated fatty acids for one year. *Pediatric Research*, 41(1), 1-10.

Ballard, O., Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49-74.

Balmer, S. E., Hanvey, L. S., Wharton, B. A. (1994). Diet and faecal flora in the newborn: nucleotides. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 70(2), 137-140.

Barnes, L. A. (1994). Dietary sources of nucleotides-from breast milk to weaning. *The Journal of Nutrition*, 124(1), 128-130.

Bar-Yoseph, F., Lifshitz, Y., Cohen, T. (2013). Review of sn-2 palmitate oil implications for infant health. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 89(4), 139-143.

Beyerlein, A., Hadders-Algra, M., Kennedy, K., Fewtrell, M., Singhal, A., Rosenfeld, E., Von Kries, R. (2010). Infant formula supplementation with long-chain polyunsaturated fatty acids has no effect on Bayley developmental scores at 18 months of age-IPD meta-analysis of 4 large clinical trials. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 50(1), 79-84.

Birch, E. E., Carlson, S. E., Hoffman, D. R., Fitzgerald-Gustafson, K. M., Fu, V. L., Drover, J. R., Marunycz, J. (2010). The DIAMOND (DHA Intake and Measurement of Neural Development) Study: a double-masked, randomized controlled clinical trial of the maturation of infant visual acuity as a function of the dietary level of docosahexaenoic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(4), 848-859.

Bongers, M. E., De Lorijn, F., Reitsma, J. B., Groeneweg, M., Taminiiau, J. A., Benninga, M. A. (2007). The clinical effect of a new infant formula in term infants with constipation: a double-blind, randomized cross-over trial. *Nutrition Journal*, 6(1), 1.

Bracco, U. (1994). Effect of triglyceride structure on fat absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 60(6), 1002-1009.

Braegger, C., Chmielewska, A., Decsi, T., Kolacek, S., Mihatsch, W., Moreno, L., Turck, D. (2012). Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 52(2), 238-250.

Brasil. Portaria nº 977, de 5 de dezembro de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, Regulamento técnico referente às fórmulas infantis para lactentes e às fórmulas infantis de seguimento. Diário Oficial da República Federativa do Brasil 1998. p. 13.

Brunser, O., Espinoza, J., Araya, M., Cruchet, S., Gil, A. (1994). Effect of dietary nucleotide supplementation on diarrhoeal disease in infants. *Acta Paediatrica*, 83(2), 188-191.

Campos, L. A., Feitosa, A. R., Pinho, L. G., Melo, M. C. (2008). Fórmulas para lactentes: repercussões na qualidade da nutrição e saúde infantil. *Revista de Pediatria*, 9, 59-65.

Carnielli, V. P., Luijendijk, I. H., Van Goudoever, J. B., Sulkers, E. J., Boerlage, A. A., Degenhart, H. J., Sauer, P. J. (1996). Structural position and amount of palmitic acid in infant formulas: effects on fat, fatty acid, and mineral balance. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 23(5), 553-560.

Carver, J. D. (2003). Advances in nutritional modifications of infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), 1550-1554.

Codex Alimentarius Commission. (2007). Standards for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants. CODEX STAN 72-108. (Formerly CAC/RS 72-1972; Adopted as a world-wide Standard in 1981. Amended 1983, 1985, and 1987; Revision 2007). Disponível em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/download/standards/288/CXS_072_e_2015.pdf].

Colombo, J., Carlson, S. E., Cheatham, C. L., Fitzgerald-Gustafson, K. M., Kepler, A., Doty, T. (2011). Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infancy reduces heart rate and positively affects distribution of attention. *Pediatric Research*, 70(4), 406-410.

Cordle, C. T., Winship, T. R., Schaller, J. P., Thomas, D. J., Buck, R. H., Ostrom, K. M., Pickering, L. K. (2002). Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: part 2: immune cell populations. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 34(2), 145-153.

Crawford, M. A., Wang, Y., Forsyth, S., Brenna, J. T. (2015). The European Food Safety Authority recommendation for polyunsaturated fatty acid composition of infant formula overrules breast milk, puts infants at risk, and should be revised. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 102, 1-3.

D'Agostini, D., Gioielli, L. A. (2002). Distribuição estereoespecífica de lipídios estruturados a partir de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38(3), 345-354.

Drover, J. R., Hoffman, D. R., Castañeda, Y. S., Morale, S. E., Garfield, S., Wheaton, D. H., Birch, E. E. (2011). Cognitive function in 18-month-old term infants of the DIAMOND study: a randomized, controlled clinical trial with multiple dietary levels of docosahexaenoic acid. *Early Human Development*, 87(3), 223-230.

EFSA NDA Panel, European Food Safety Authority. (EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies) (2014). Scientific opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. *EFSA J*, 12, 3760.

Eidelman, A. I., Schanler, R. J., Johnston, M., Landers, S., Noble, L., Szucs, K., Viehmann, L. (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 129(3), 827-841.

Epifanio, M. (2012). Prebióticos e probióticos nas fórmulas infantis: o que temos de evidência? *Boletim Científico de Pediatria*, 1(1), 9-15.

Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., Rodríguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 1-10.

Foiles, A. M., Kerling, E. H., Wick, J. A., Scalabrin, D. M., Colombo, J., Carlson, S. E. (2016). Formula with long-chain polyunsaturated fatty acids reduces incidence of allergy in early childhood. *Pediatric Allergy and Immunology*. 27(2), 156-16.

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.

Fomon, S. J. (1993). Procedures for collection of urine and feces and for metabolic balance studies. *Nutrition of Normal Infants*, 459-464.

Giovannini, M., Verduci, E., Gregori, D., Ballali, S., Soldi, S., Ghisleni, D., Riva, E. (2014). Prebiotic effect of an infant formula supplemented with galacto-oligosaccharides: randomized multicenter trial. *Journal of the American College of Nutrition*, 33(5), 385-393.

Guillén-López, S., Vela-Amieva, M. (2010). Desventajas de la introducción de la leche de vaca en el primer año de vida. *Acta Pediátrica de México*, 31(3), 123-128.

Hamosh, M. (1996). Digestion in the newborn. *Clinics in Perinatology*, 23(2), 191-209.

Heird, W. C. (2007). Progress in promoting breast-feeding, combating malnutrition, and composition and use of infant formula, 1981–2006. *The Journal of Nutrition*, 137(2), 499-502.

Hernell, O. (2011). Human milk vs. cow's milk and the evolution of infant formulas. In Clemens, R. A., Hernell, O., Michaelsen, K. F. (Eds.), *Milk and Milk Products in Human Nutrition*. Nestlé Nutrition Institute in Pediatric Journal, vol 67, pp 17–28.

Innis, S. M. (1992). Human milk and formula fatty acids. *The Journal of Pediatrics*, 120(4), S56-S61.

Innis, S. M., Dyer, R., Nelson, C. M. (1994). Evidence that palmitic acid is absorbed as sn-2 monoacylglycerol from human milk by breast-fed infants. *Lipids*, 29(8), 541-545.

Innis, S. M. (2011). Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 2(3), 275-283.

Innis, S. M. (2013). Maternal nutrition, genetics, and human milk lipids. *Current Nutrition Reports*, 2(3), 151-158.

Innis, S. M. (2014). Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(3), 734-741.

Jensen, R. G., Ferris, A. M., Lammi-Keefe, C. J. (1992). Lipids in human milk and infant formulas. *Annual Review of Nutrition*, 12(1), 417-441.

Jensen, R. G. (1996). The lipids in human milk. *Progress in Lipid Research*, 35(1), 53-92.

Jensen, R. G. (1999). Lipids in human milk. *Lipids*, 34(12), 1243-1271.

Kim, J., Friel, J. (2012). Lipids and human milk. *Lipid Technology*, 24(5), 103-105.

Koo, W. W., Hammami, M., Margeson, D. P., Nwaesei, C., Montalto, M. B., Lasekan, J. B. (2003). Reduced bone mineralization in infants fed palm olein-containing formula: a randomized, double-blinded, prospective trial. *Pediatrics*, 111(5), 1017-1023.

Koo, W. W., Hockman, E. M., Dow, M. (2006). Palm olein in the fat blend of infant formulas: effect on the intestinal absorption of calcium and fat, and bone mineralization. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 117-122.

Lauritzen, L. A., Hansen, H. S., Jorgensen, M. H., Michaelsen, K. F. (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress in Lipid Research*, 40(1), 1-94.

Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. Nucleotídeos e Ácidos Nucleicos. In: Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. (Eds.) *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1995. cap. 12. p. 242-268.

Leite, M. E. Q., Lasekan, J., Baggs, G., Ribeiro, T., Menezes-Filho, J., Pontes, M., Souza, C. O., Druzian, J. I., Costa-Ribeiro, H. (2013). Calcium and fat metabolic balance, and gastrointestinal tolerance in term infants fed milk-based formulas with and without palm olein and palm kernel oils: a randomized blinded crossover study. *BMC Pediatrics*, 13(1), 1-9.

Lloyd, B., Halter, R. J., Kuchan, M. J., Baggs, G. E., Ryan, A. S., Masor, M. L. (1999). Formula tolerance in post-breastfed and exclusively formula-fed infants. *Pediatrics*, 103(1), 1-7.

Lönnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), 1537-1543.

Lönnerdal, B. (2014). Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(3), 712-717.

López-López, A., Castellote-Bargalló, A. I., Campoy-Folgoso, C., Rivero-Urgel, M., Tormo-Carnicé, R., Infante-Pina, D., López-Sabater, M. C. (2001). The influence of dietary palmitic acid triacylglyceride position on the fatty acid, calcium and magnesium contents of at term newborn faeces. *Early Human Development*, 65, 83-94.

Makrides, M., Neumann, M. A., Byard, R. W., Simmer, K., Gibson, R. A. (1994). Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast-and formula-fed infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 60(2), 189-194.

Makrides, M., Neumann, M. A., Simmer, K., Gibson, R. A. (1995). Erythrocyte fatty acids of term infants fed either breast milk, standard formula, or formula supplemented with long-chain polyunsaturates. *Lipids*, 30(10), 941-948.

Makrides, M., Gibson, R. A., Udell, T., Ried, K. (2005). Supplementation of infant formula with long-chain polyunsaturated fatty acids does not influence the growth of term infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(5), 1094-1101.

Martinez, A., Ballew, M. (2011). Infant formulas. *Pediatrics in Review*, 32, 179-189.

Millán Jiménez, A. (2005). Papel de los nucleótidos en la alimentación del lactante. *Anales de Pediatría*, 3(1), 34-42.

Moreno-Villares, J. M. (2011). Actualización en fórmulas infantiles. *Anales de Pediatría Continuada*, 9(1), 31-40.

Nelson, S. E., Rogers, R. R., Frantz, J. A., Ziegler, E. E. (1996). Palm olein in infant formula: absorption of fat and minerals by normal infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 64(3), 291-296.

Nelson, S. E., Frantz, J. A., Ziegler, E. E. (1998). Absorption of fat and calcium by infants fed a milk-based formula containing palm olein. *Journal of the American College of Nutrition*, 17(4), 327-332.

Nguyen, T. T., Bhandari, B., Cichero, J., Prakash, S. (2015). A comprehensive review on in vitro digestion of infant formula. *Food Research International*, 76(3), 373-386.

Nowacki, J., Lee, H. C., Lien, R., Cheng, S. W., Li, S. T., Yao, M., Mutungi, G. (2014). Stool fatty acid soaps, stool consistency and gastrointestinal tolerance in term infants fed infant formulas containing high sn-2 palmitate with or without oligofructose: a double-blind, randomized clinical trial. *Nutrition Journal*, 13(1), 1.

Oliveira, H. R., Gazzola, J., Curi, R., Pompéia, C., Miyasaka, C. K., Procopio, J. (2002). Digestão dos triacilgliceróis. *Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manole*, 43-8.

Ostrom, K. M., Borschel, M. W., Westcott, J. E., Richardson, K. S., Krebs, N. F. (2002). Lower calcium absorption in infants fed casein hydrolysate-and soy protein-based infant formulas

containing palm olein versus formulas without palm olein. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(6), 564-569.

Panel, E. N. (2014). Scientific opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. *EFSA J.*, 12, 3760.

Picciano, M. F. (2001). Nutrient composition of human milk. *Pediatric Clinics of North America*, 48(1), 53-67.

Pickering, L. K., Granoff, D. M., Erickson, J. R., Masor, M. L., Cordle, C. T., Schaller, J. P., Hilty, M. D. (1998). Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing nucleotides. *Pediatrics*, 101(2), 242-249.

Prentice, A. (1995). Regional variations in the composition of human milk. In: Jensen R.G., ed. *Handbook of milk composition*. San Diego: Academic Press, 1995. p.115-221. (Food science and technology international series).

Qawasmi A, Landeros-Weisenberger A, Leckman JF, Bloch MH. (2012). Meta-analysis of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula and infant cognition. *Pediatrics*. 129(6), 1141-1149.

Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 830-837.

Robinson, S., Ntani, G., Simmonds, S., Syddall, H., Dennison, E., Sayer, A. A., Cooper, C. (2013). Type of milk feeding in infancy and health behaviours in adult life: findings from the Hertfordshire Cohort Study. *British Journal of Nutrition*, 109(6), 1114-1122.

Rocha, H. F. (2008). Fórmulas infantis: uma bem vinda revisão de um tema necessário. *Revista de Pediatria*, 9(2), 55-61.

Rogalska, E., Ransac, S., Verger, R. (1990). Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. *Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20271-20276.

Schulzke, S. M., Patole, S. K., Simmer K. (2008) Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2, CD000375.

Silva, M. H., Silva, M. T. C., Brandão, S. C., Gomes, J. C., Peternelli, L. A., Franceschini, S. (2005). Fatty acid composition of mature breast milk in Brazilian women. *Food Chemistry*, 93(2), 297-303.

Silva, R. C., Escobedo, J. P., Gioielli, L. A., Quintal, V. S., Ibbidi, S. M., Albuquerque, E. M. (2007). Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. *Química Nova*, 30(7), 1535-1538.

Simmer, K., Patole, S. K., Rao, S. C. (2011). Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants born at term. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, CD000376.

Singhal, A., Macfarlane, G., Macfarlane, S., Lanigan, J., Kennedy, K., Elias-Jones, A., Lucas, A. (2008). Dietary nucleotides and fecal microbiota in formula-fed infants: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(6), 1785-1792.

Singhal, A., Kennedy, K., Lanigan, J., Clough, H., Jenkins, W., Elias-Jones, A., Lucas, A. (2010). Dietary nucleotides and early growth in formula-fed infants: a randomized controlled trial. *Pediatrics*, 126(4), 946-953.

Tinoco, S. M. B., Sichieri, R., Moura, A. S., Santos, F. D. S., Carmo, M. G. T. (2007). Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos *trans* do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. *Caderno de Saúde Pública*, 23(3), 525-534.

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), 885-895.

Uauy, R., Hoffman, D. R., Mena, P., Llanos, A., Birch, E. E. (2003). Term infant studies of DHA and ARA supplementation on neurodevelopment: results of randomized controlled trials. *The Journal of Pediatrics*, 143(4), 17-25.

Uauy, R., Mena, P. (2015). Long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation in preterm infants. *Current Opinion in Pediatrics*, 27(2), 165-171.

Willatts, P., Forsyth, S., Agostoni, C., Casaer, P., Riva, E., Boehm, G. (2013). Effects of long-chain PUFA supplementation in infant formula on cognitive function in later childhood. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(2), 536-542.

Winter, C. H., Hoving, E. B., Muskiet, F. A. (1993). Fatty acid composition of human milk triglyceride species: possible consequences for optimal structures of infant formula triglycerides. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 616(1), 9-24.

World Health Organization. (2001). *The optimal duration of exclusive breastfeeding. Report of the expert consultation. Geneva, Switzerland. 2001. Document WHO/NHD/01.09.*

Young, R. J., Antonson, D. L., Ferguson, P. W., Murray, N. D., Merkel, K., Moore, T. E. (2005). Neonatal and infant feeding: effect on bone density at 4 years. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 41(1), 88-93.

8. RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir deste trabalho são apresentados nos artigos abaixo.

- **Prospecção Tecnológica:** “Prospecção tecnológica sobre a suplementação nutricional de fórmulas infantis com ácidos graxos”
- **Artigo Original:** “Milk protein-based formulas containing different oils affect fatty acids balance in term infants: a randomized blinded crossover clinical trial”

8.1 Artigo 1 – Prospecção Tecnológica

Prospecção tecnológica sobre a suplementação nutricional de fórmulas infantis com ácidos graxos

Anais Simtec - ISSN: 2318-3403

Publicado em setembro de 2013

Vol. 1/n. 1/ p. 211-222

D.O.I.: 10.7198/S2318-34032013001018

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA SOBRE A SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE FÓRMULAS INFANTIS COM ÁCIDOS GRAXOS

Carolina Oliveira de Souza¹, Janice Izabel Druzian² e Hugo da Costa Ribeiro Júnior³

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brasil.

²Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brasil.

³Centro de Pesquisas Fima Lifshitz - Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Salvador-BA, Brasil.

Resumo: As fórmulas infantis são leites modificados com o objetivo de atender às necessidades nutricionais específicas do lactente no primeiro ano de vida, visando diminuir o impacto sobre a saúde das crianças privadas do leite materno. O lactente não é capaz de sintetizar todo o aporte necessário de ácidos graxos, sendo suprido pelo aleitamento materno. Porém, quando a amamentação é impossibilitada, fórmulas infantis são uma alternativa para a alimentação do bebê. Este estudo prospectivo teve como objetivo realizar um levantamento do número de patentes mundiais relacionadas à adição de ácidos graxos como suplementação em fórmulas infantis. Para tanto, foi realizada uma pesquisa a partir de palavras-chave do tema abordado com os códigos da classificação internacional na base de dados do escritório europeu Espacenet®. Foram realizadas análises em relação à evolução anual das patentes depositadas, a origem das tecnologias, distribuição por países, detentores de tecnologia e inventores. Os Estados Unidos é o país que possui o maior número de patentes depositadas, bem como inventores e empresas depositantes.

Palavras-chave: fórmula infantil, ácidos graxos, prospecção, monitoramento tecnológico.

Abstract: The infant formulas are milk modified in order to meet the specific nutritional needs of infants during the first year of life, in order to lessen the impact on the health of children deprived of breast milk. The infant is unable to synthesize long chain polyunsaturated fatty acids, being then supplied by breastfeeding, but when breastfeeding is impossible, infant formulas are an alternative to feeding the baby. This prospective study aimed to survey the number of worldwide patents related to the addition of fatty acids as supplements in infant formulas. For this, a survey was conducted from keywords of the subject and with the codes of the international classification in the database of Espacenet European office. Analyses were made regarding the evolution of annual patents, sources of technologies, breakdown by country, technology holders and inventors. The United States is the country that has the largest number of patents, inventors and companies, as well as depositors.

Keywords: infant formula, fatty acids, technology assessment, technological monitoring.

Introdução

Os ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos, geralmente mono carboxílicos, que podem ser representados pela forma de RCO_2H . Na maioria das vezes, o grupamento R é uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com número par de átomos de carbono, podendo ser saturada ou conter uma ou mais insaturações (GRAZIOLA et al., 2002). A cadeia hidrocarbonada de um AG saturado (AGS) está sob forma estendida, uma vez que sua conformação linear é o estado de menor energia. Essa conformação permite um melhor empacotamento dos AG, fazendo com que as moléculas fiquem mais próximas umas das outras, aumentando a interação entre elas (GRAZIOLA et al., 2002). Os AG insaturados (AGI) possuem uma ou mais insaturações na molécula (monoinsaturados e poli-insaturados), essa dupla ligação não permite um empacotamento tão eficiente, fazendo com que as interações entre elas sejam menores (BOBBIO & BOBBIO, 2004).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) podem ser classificados de acordo com a posição da dupla ligação e divididos em famílias; as mais importantes são dos AG ω -9, ω -6 e ω -3. A nomenclatura ômega (ω) é definida segundo a numeração do carbono associada à primeira dupla ligação a partir do radical metila. (HIRAYAMA et al., 2006). Os principais representantes dessas classes são o ácido oléico (ω -9), o ácido linoléico (LA, ω -6) e o ácido α -linolênico (ALA, ω -3) (BENATTI et al., 2004).

Os ácidos graxos essenciais (LA e ALA) compõem uma classe de moléculas que não podem ser geradas pelo organismo, devido à carência de enzimas desaturases, que são capazes de inserir ligação dupla entre os carbonos 3-4 e 6-7, assim como de enzimas hidrogenases capazes de remover tais insaturações. A ausência de tais nutrientes na dieta está associada a síndromes que podem levar à morte. Esses AGs são sintetizados exclusivamente, pelo reino vegetal (VAZ et al., 2006). Há duas subclasses de AGE – os ômega 3 e os ômega 6. A essencialidade dos últimos é conhecida desde a década de 1930, sua deficiência está associada, principalmente, à problemas dérmicos. Quanto aos AG ω -3, apenas após a década de 1980 descobriu-se sua necessidade na dieta, principalmente para evitar distúrbios neurológicos e visuais. Os AGE podem ser modificados pelos mamíferos, com alongamento da cadeia, inserção de insaturações e descarboxilação de pares da cadeia (POMPÉIA, 2002).

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPICL), ou seja, aqueles ácidos graxos poli-insaturados de 20-22 carbonos (Ex: ARA - ácido araquidônico 20:4n6 e DHA - ácido docosahexaenóico 22:6n3), possuem diversos papéis metabólicos e fisiológicos. São componentes estruturais de membranas, podendo modificar sua fluidez e afetar a transcrição

gênica (CARVER, 2003).

Lactente não tem a capacidade de sintetizar AGPICL através de seus precursores, devido à imaturidade hepática, tendo sua necessidade suprima pelo leite materno. Os AGPICL são essenciais em prematuros com pouca reserva lipídica; pela limitada reserva calórica, os mesmos deverão mobilizar parte desses ácidos graxos para atender suas necessidades quando o aporte exógeno for inadequado (SILVA et al., 2007).

A melhor forma de assegurar a oferta de AGPICL para o lactente é através do leite materno, porém quando a prática da amamentação é impossibilitada, o uso de fórmulas infantis (FI) aparece como uma alternativa para a alimentação do bebê. Apesar do avanço no processo tecnológico, as FI ainda apresentam grandes diferenças na composição quando comparadas ao leite materno, com o intuito de estreitar essa diferença a partir de 2002, nos Estados Unidos, entre outras intervenções, as FI passaram a ser suplementadas com AGPICL. No Brasil, as FI começaram a ser comercializadas com AGPICL no início de 2008 (CARVER et al., 2007).

Este estudo prospectivo teve como objetivo realizar um levantamento do número de documentos de patentes depositados mundialmente relacionadas com a utilização de ácidos graxos como suplementação em fórmulas infantis, com o intuito de mostrar a evolução destes produtos, bem como, os principais detentores da tecnologia.

Descrição da Tecnologia

Fórmulas infantis são compostos nos quais se utiliza a proteína isolada do leite de vaca e/ou da soja, intactas ou hidrolisadas e todos os demais nutrientes são acrescidos, separadamente, nas quantidades e proporções recomendadas para lactentes até um ano de vida (ANVISA, 2011).

Desde tempos pré-históricos até um passado recente o aleitamento materno foi o único meio de alimentar lactentes. Quando a mãe se recusava a amamentar ou quando falecia os recém-nascidos morriam por inanição. A primeira tentativa de aleitamento artificial documentada, através de uma múmia é data de 3000 anos atrás (ROCHA, 2008).

A evolução das fórmulas infantis foi mais estimulada por motivos econômicos do que pediátricos. A partir do século XIX as empresas que se dedicaram a substituir o leite materno tiveram sempre grande participação nas pesquisas e na promoção do ensino médico. Houve um processo, idealizado ou consequente, no qual o resultado foi a desvalorização do aleitamento materno e a valorização do uso das fórmulas lácteas. As consequências diretamente evidenciáveis foram: o aumento da morbidade, desnutrição e mortes de crianças, em especial

nos países mais pobres (GIUGLIANI, 1994). A conscientização da importância do leite materno e as legislações de vários países trouxeram, embora ainda em não todos, o equilíbrio entre o aleitamento materno e o espaço para o uso de fórmulas infantis valorizando o aleitamento ao seio e regulando o uso de fórmulas (MONTEIRO, 2006).

A composição das fórmulas infantis se tornou um desafio para obtenção do máximo de benefícios possíveis à nutrição do lactente, quando o seu uso for imperioso. Para isto, necessitam-se de nutrientes que atendam as demandas nutricionais e ao mesmo tempo se adaptem a ser acondicionados na forma desidratada, recuperando a biodisponibilidade e as propriedades requeridas para os benefícios do lactente. As últimas aquisições na composição das fórmulas são melhorias na composição de proteínas hidrolisadas, adição de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e micro-organismos que tentam estabelecer uma flora intestinal similar à natural desenvolvida com o leite materno (ROCHA, 2008).

Escopo

Nesse trabalho foi realizada uma pesquisa na base de dados *on line* do escritório europeu Espacenet® (EP), que abrange patentes depositadas e publicadas em mais de 90 países, incluindo, os pedidos de patentes depositadas no Brasil (Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI) e nos Estados Unidos (*United States Patent and Trademark Office* - USPTO). Para a pesquisa da tecnologia protegida ou descrita em documentos de patentes referente à utilização de ácidos graxos em formulas infantis, foi elaborada uma estratégia de busca que combinou os campos da Classificação Internacional de Patentes, nos quais os documentos relativos a esta tecnologia estão classificados, associado às palavras-chave (fatty acids and infant formula) que representam as formas como podem ser identificados nos documentos (Tabela 1). O termo documento de patente abrange pedidos de patente publicados ou patentes concedidas. Esta estratégia, aplicada a bases de dados Espacenet®, resultou no número de documentos mostrado na Figura 1.

Tabela 1. Busca de patentes por palavras-chave, agrupamento das palavras e códigos de classificação internacional de patentes na base de dados europeia (Espacenet®).

| Palavras-Chave | Espacenet |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| Fatty* and acid* | 100.000 |
| Infant* and formula* | 1.947 |
| Fatty* and acid* and infant* and formula* | 87 |
| Fatty* and acid* and infant* and formula* and A23L1/30 | 50 |
| Fatty* and acid* and infant* and formula* and A23L1/29 | 46 |
| Fatty* and acid* and infant* and formula* and A23D9/00 | 21 |
| Fatty* and acid* and infant* and formula* and A61K31/202 | 18 |
| Fatty* and acid* and infant* and formula* and A23C11/04 | 17 |
| Fatty* and acid* and infant* and formula* and A23C9/152 | 14 |

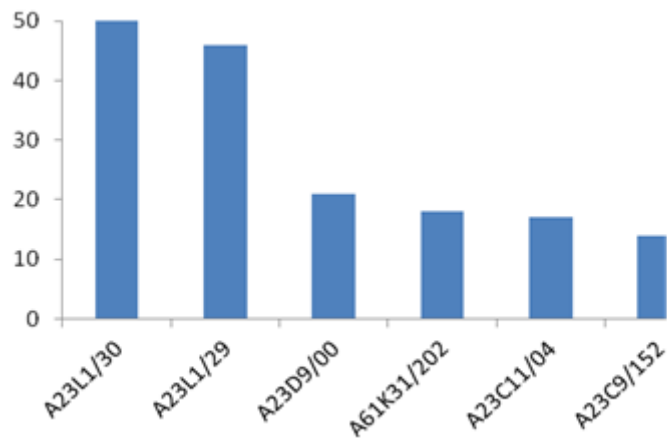


Figura 1. Distribuição de patentes por códigos da classificação internacional.

A23L1/29: Modificações nas qualidades nutritivas de alimentos; A23L1/30: Alimentos, produtos alimentícios contendo aditivos; A61K31/202: Preparações medicinais contendo ingredientes ativos orgânicos tendo três ou mais duplas ligações; A23D9/00: Outros óleos ou gorduras comestíveis; A23C11/04: Substitutos do leite contendo gorduras que não sejam do leite, porém nenhuma proteína que não seja do leite; A23C9/152: Preparações de leite; Leite em pó ou preparações de leite em pó contendo aditivos.

Resultados e Discussão

A Figura 2 demonstra a evolução anual de depósitos de patentes relacionados à utilização de ácidos graxos em fórmulas infantis desde o primeiro registro em 1967 até o ano de 2012, totalizando 87 documentos. Estes depósitos estão relacionados às áreas de alimentos, ciências médicas, química e bioquímica. A primeira patente (US3542560) do ano de 1967, relata um processo para a preparação de uma fórmula infantil similar ao leite materno contendo ácido palmítico como principal gordura. Já a segunda (US19700042550), do ano de 1973, de detenção de uma empresa americana (American Home Products Corporation), descreve uma formulação de óleos a ser inserido em fórmulas infantis. Trata-se de uma formulação do tipo “não leite” contendo lecitina de soja e um mix de gorduras (óleo de soja, óleo de girassol, óleo de coco, óleo de algodão, óleo de milho e óleo de babaçu).

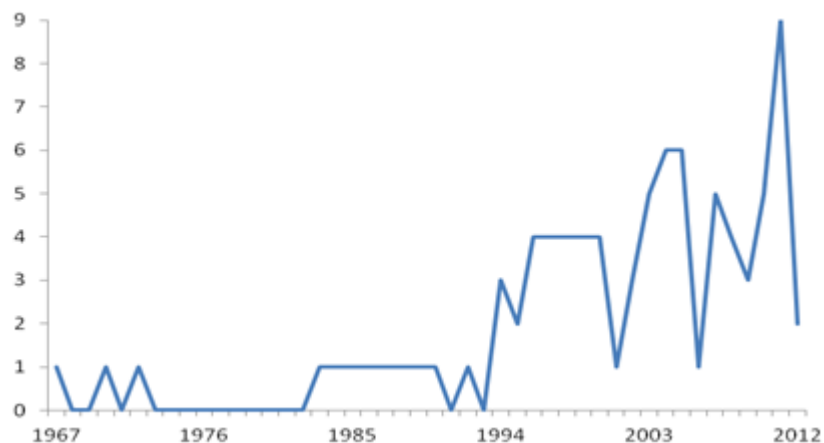


Figura 2. Evolução anual do depósito de patentes sobre ácidos graxos em fórmulas infantis na base europeia, entre os anos de 1972 e 2012.

A partir do ano de 2002 nos Estados Unidos, passou a ser realizada a suplementação de fórmulas infantis com ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. Analisando a figura 2 é possível observar que nos anos após a iniciativa do governo norte americano, ocorre um pico no número de documentos (anos de 2004 e 2005, 6 documentos cada). As principais patentes deste período estão relacionadas à inserção de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico em fórmulas para lactentes. No ano de 2011, ocorre o maior número de depósitos, cinco dos 11 documentos referentes a esse período, estão relacionados ao melhoramento nutricional.

A análise do banco de dados de depósito de patentes distribuídas por países nos quais se originam a tecnologia patenteada, revelam que esta se encontra bastante concentrada nos países mais desenvolvidos, sendo que o cenário é largamente dominado pelos Estados Unidos, de onde provém cerca de 46% (39 documentos) do total de documentos depositados. A China vem a seguir, com cerca de 9% (8 documentos). Outros três países apresentam uma quantidade representativa de patentes: o Canadá 7%, a República da Coreia 7% e a Nova Zelândia 7% (6 documentos cada). O Japão, provém 5% (4 documentos) e outros países, 9 no total, somados atingem 19% das patentes depositadas (Figura 3).

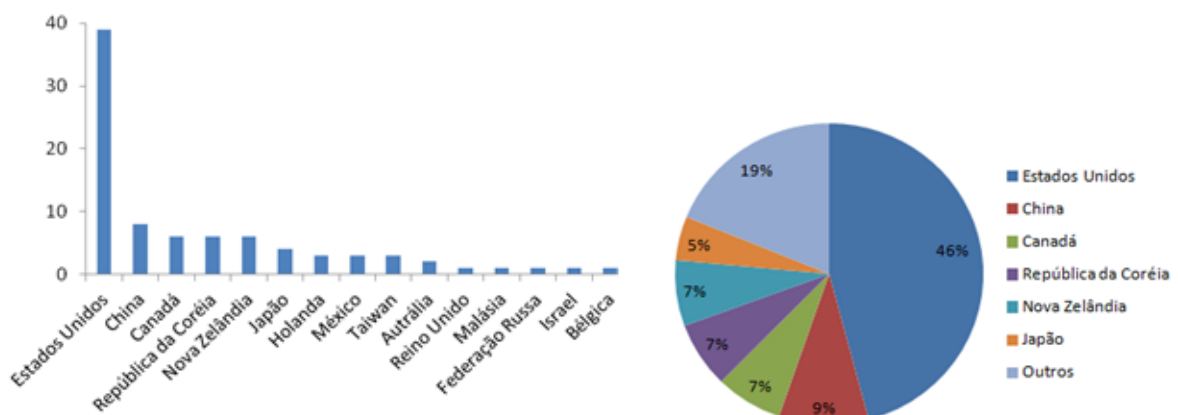


Figura 3. Distribuição de depósitos de patentes por país de origem da tecnologia.

O resultado da análise dos detentores de tecnologia mostra um quadro bastante similar ao dos países de origem, tendo os Estados Unidos como destaque. Dentre as empresas mais expressivas está a Abbott Lab dos Estados Unidos, que possui 13% das patentes depositadas, a Nestec S.A. da Suíça com 3,6% e juntos com 2,1% cada, estão a Squibb Bistol, a Martek Biosciences (ambas dos Estados Unidos) e o inventor independente Groenendaal Jan Willem da Holanda. Apesar de haver um grande número de depositantes que possuem patentes, 140 no total, a grande maioria detém poucos documentos (Figura 4).

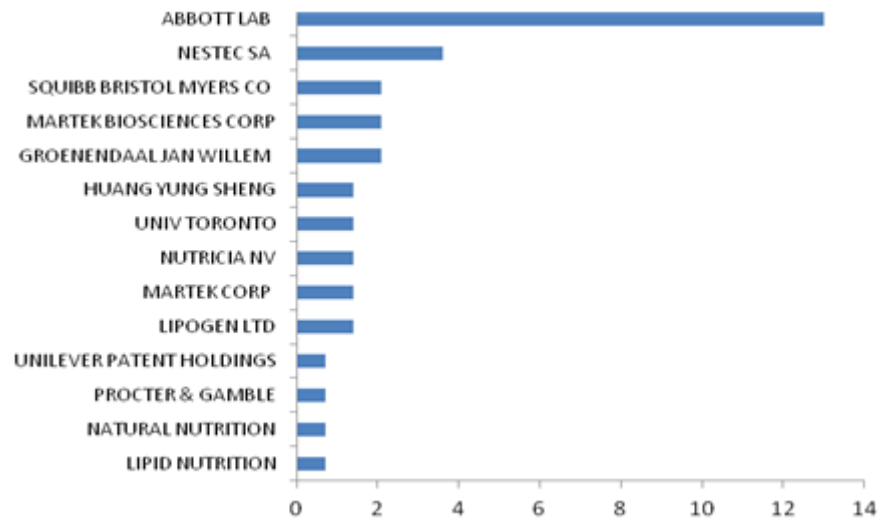


Figura 4. Distribuição de patentes por depositantes na base europeia.

Entre os inventores que mais detém a tecnologia na área de utilização de ácidos graxos em fórmulas infantis, estão os originários dos Estados Unidos. Dos 185 inventores, 41% são norte americanos, seguido pelos chineses (10%), canadenses (6%) e coreanos (5%). Entre os principais inventores, destacam-se Mukerji Pradip, diretor de P&D da Abbott Nutrition, Huang Yung-Seheng, pesquisador P&D na Abbott Nutrition e Groenendaal J Willem, pesquisador da Gist-Brocades N.V., todos com 4 patentes depositadas (Figura 5).

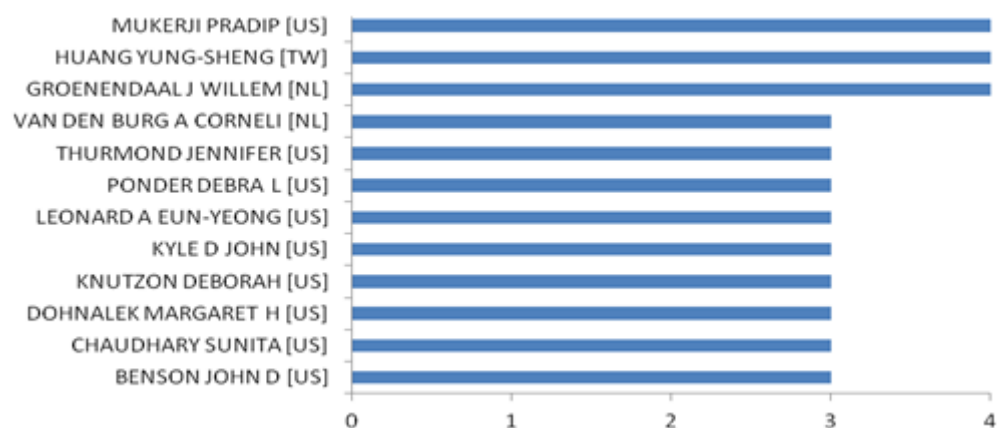


Figura 5. Inventores com maior número de patentes depositadas na base europeia.

Em relação aos códigos de classificação internacional, foram encontrados 629 códigos diferentes, sendo que destes foram selecionadas os com maior número de ocorrências (Figura 6).

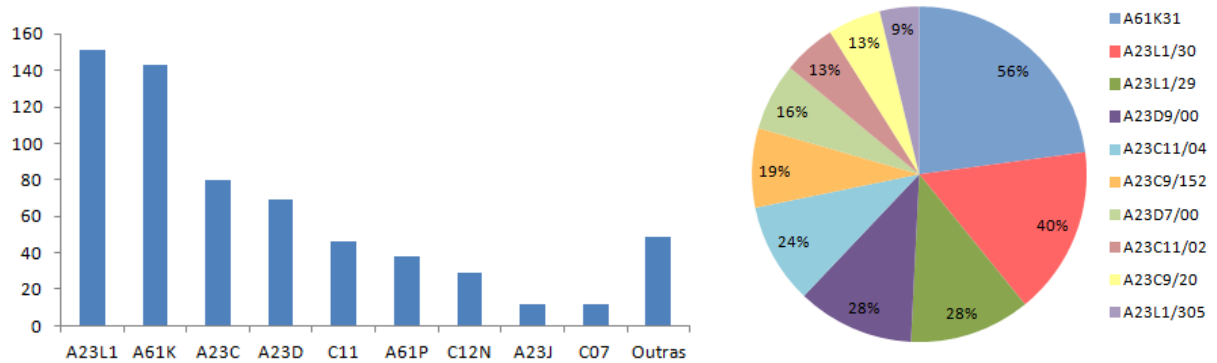


Figura 6. Número de patentes depositadas por código de classificação internacional.

Através dos dados apresentados, pôde-se verificar que a maior parte das patentes estão relacionadas a alimentos/produtos alimentícios (C23L1) e preparações para finalidades médicas (A61K). Posteriormente surgem as patentes relacionadas à produtos de laticínio e substitutos do leite (A23C). Ainda é possível constatar que do total de 151 patentes relacionadas à classificação C23L1, 40% são alimentos e produtos alimentícios contendo aditivos e 28% estão relacionadas à modificações na qualidade nutricional dos alimentos. Já referente à classificação A61K (143 documentos), os destaques são preparações medicinais contendo ingredientes ativos (A61K31 - 56%). A classificação AC23 apresentou 80 documentos divididos principalmente nos códigos A23C11/04 (substitutos do leite contendo gorduras que não sejam do leite, porém nenhuma proteína que não seja do leite), A23C9/152 (preparações de leite; Leite em pó ou preparações de leite em pó contendo aditivos), A23C11/02 (substitutos do leite contendo, pelo menos, um componente que não seja do leite como fonte das gorduras ou proteínas) e AC23C9/20 (preparações medicinais contendo ingredientes ativos orgânicos com um grupo carboxila ligado a uma cadeia acíclica contendo pelo menos sete átomos de carbono), estes códigos apresentaram respectivamente 24%, 19%, 13% e 13%.

Fórmulas Infantis

Sabe-se por diversos registros históricos, que quando um bebê não era amamentado por sua mãe (fato raro em muitas épocas, mas comum em algumas outras notadamente em determinadas classes sociais), sua alimentação era substituída pelo leite de peito dado por outra mãe “amas – de - leite” (STEVENS, 2009).

A descoberta, em 1838, na Alemanha, de que o leite bovino apresentava maior concentração de proteínas representou um marco e um impulso para o desenvolvimento de alimentação artificial. Além disso, a descoberta de Gail Borden, em 1856, do método de produzir leite condensado, cria finalmente uma alternativa de um leite estéril e passível de conservação (REA, 1990). O primeiro registro de uma fórmula infantil que se tem conhecimento é do químico alemão Justus Von Liebig, que desenvolveu, patenteou e comercializou um alimento para lactentes, primeiramente na forma líquida, e em seguida, na forma de pó para uma melhor conservação. A fórmula consistia de leite de vaca, farinha de trigo, malte e bicarbonato de potássio, sendo considerada uma alimentação infantil perfeita (CAMPOS, 2008). Tal patente não foi encontrada na base de dados europeia, no entanto, a mesma foi relatada no Alphabetical Index of Patentees and Applicants for Patents of Invention, escrito por Bennet Woodcroft, Londres 1867. A patente foi intitulada “Concentrado de leite para alimentação de crianças e inválidos” depositada em 29 de novembro de 1866, sob o número 3142.

Outras descobertas-chave, ainda no final do século passado, na história da alimentação artificial infantil, são a da evaporação do leite de vaca e cabra, em 1883, por Meyenberg, e a composição do leite humano, por Meigs, nos EUA, em 1885. Entretanto, pesquisas mostraram um desenvolvimento inferior das crianças alimentadas com leites de animais em relação às aleitadas pelo materno (BENSON, 1994). Ao se comparar a constituição do leite materno com o leite de vaca, há diferenças relevantes tais como: o leite de vaca é deficiente de ácidos graxos essenciais para o neurodesenvolvimento, contém proteínas com alto poder alergênico (AGOSTINI, 2003).

Muitas fórmulas foram rapidamente introduzidas no mercado após a comercialização da fórmula de Justus Von Liebig e a invenção do leite evaporado (RADBILL, 1981). Em 1883, havia 27 marcas patenteadas de alimentos para lactentes. Estes produtos comerciais eram apresentados em forma de pó e consistiam de hidratos de carbono, tais como açúcares, amidos e dextrina adicionadas ao leite. As principais marcas incluíam “Nestlé’s Food®, Horlick's Malted Milk®, Hill's Malted Biscuit Powder®, Mellin's Food®, Eskay's Food®, Imperial

Granum® e Robinson's Patent Barley®” (FOMON, 2001). Os alimentos faziam as crianças ganharem peso, mas eram deficientes em nutrientes primordiais como proteínas, vitaminas, minerais e principalmente ácidos graxos essenciais. Ao longo do tempo, os nutrientes foram adicionados individualmente às formulações (RADBILL, 1981).

As primeiras pesquisas realizadas para o desenvolvimento de fórmulas com um conteúdo adequado de nutrientes foram realizadas nos Estados Unidos, fato este que corrobora os resultados encontrados, uma vez que tal país apresentou o maior número de patentes depositadas bem como detentores da tecnologia e inventores (BARROS-FILHO, 2010).

Em 1920 a empresa norte americana "Ross" (hoje "Abbott-Ross") lança o "Similac" em 1925, fórmulas preparadas especialmente para uso infantil. Logo depois, em 1929 entra no mercado americano a Mead-Johnson, com a primeira fórmula à base de soja produzida comercialmente - o "Sobee". De acordo com o presente trabalho a Abbott Laboratories foi a principal empresa depositante de patentes na área de fórmulas infantis suplementadas com ácidos graxos, com um total de 13 documentos (BARNES, 1987).

No início da década de 20, vários médicos adotaram o “método americano” ou “método percentual” para prescrever fórmulas; o objetivo era fornecer um produto que se assemelhasse ao leite materno e considerar também a capacidade individual do lactente. É por causa da complexidade de cálculos necessários para se chegar à composição ‘ideal’ que vem a palavra “fórmula” para designar tais produtos (BARROS-FILHO, 2010).

Da década de 30 até a década de 60 constatou-se alta prevalência de anemia em lactentes devido à redução no aleitamento materno e introdução de outros alimentos cada vez mais em idade precoce. No entanto, apenas em 1959 foi criada a primeira fórmula fortificada com ferro (FOMON, 2001).

Entre as décadas de 70 a 90 surgiram inúmeras descobertas científicas a respeito das necessidades nutricionais da criança nos primeiros anos de vida, o papel fundamental do leite materno e seus constituintes, o prejuízo causado pelo uso de leite de vaca integral nos primeiros meses de vida e o risco do uso de água contaminada no preparo da mamadeira. Em 1971, foram incluídos o mínimo de proteína, gordura, ácido linolêico e 17 vitaminas e minerais às fórmulas. A partir de então, houve uma crescente utilização de fórmulas em pó, concomitante a um impulso do aleitamento materno. Nos anos 80 a produção das fórmulas infantis foi regulamentada e as empresas passaram a sofrer um rigoroso controle do governo norte-americano, através do FDA (Food and Drug Administration) (FOMON, 2001; BARROS-FILHO, 2010).

Através do gráfico da evolução anual do depósito de patentes (Figura 2), é possível observar que entre os anos de 1983 e 1990, houve um constante depósito de documentos, justamente em um período em que as pesquisas voltadas para as necessidades nutricionais estavam acontecendo. Em 1983, uma universidade do Canadá registra uma patente (US4670285) contendo uma formulação de gorduras para serem inseridas em fórmulas infantis. O diferencial, foi a quantidade e o conteúdo de ácidos graxos inseridos, sendo priorizados os ácidos graxos da família omega-3 e omega-6. Em 1988, a empresa holandesa Unilever, propõe um substituto para a gordura do leite (US4876107), através da utilização de um glicídio de ácido palmítico (principal ácido graxo do leite humano) substituído através de rearranjos seletivos.

Nos últimos anos, grandes produtores de alimentos lácteos, juntamente com grupos científicos, têm realizado modificações nas fórmulas, com o objetivo de torná-las mais semelhante, qualitativamente, ao leite materno. Alcançar um padrão lipídico similar ao de crianças alimentadas com leite humano é uma das principais metas das fórmulas para lactentes. Uma das dificuldades para se atingir esse objetivo é a grande variabilidade nas taxas de lipídios presentes no leite humano, de acordo com a genética, com o estágio de lactação e principalmente com a alimentação prévia e atual. (BARROS-FILHO, 2010). Com o intuito de estreitar as diferenças entre as fórmulas e o leite materno, em 2002, nos Estados Unidos as fórmulas infantis passaram a ser suplementadas com ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (CARVER et al., 2007). A Abbott Laboratories em 1990, foi a primeira empresa a patentear (US5709888) uma fórmula para lactentes contendo tais ácidos graxos (ARA e DHA).

Conclusões

Os dados coletados demonstram que os Estados Unidos é o mercado de maior interesse para proteção da tecnologia avaliada, apresentando o maior número de patentes depositadas bem como empresas depositantes e inventores. A maior parte das patentes está relacionada a alimentos e produtos alimentícios contendo aditivos e modificações na qualidade nutricional dos alimentos. As empresas detentoras das tecnologias, como esperado, estão agrupadas nas áreas farmacêutica e alimentícia.

As últimas aquisições na composição das fórmulas são melhorias na composição de proteínas hidrolisadas, adição de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e os microorganismos vivos (liofilizados) que tentam estabelecer flora intestinal similar a natural desenvolvida com o leite materno. No entanto, novas pesquisas estão voltadas para as

repercussões no desenvolvimento neural, obesidade e efeitos imunológicos, comparado com o padrão ouro que é o leite humano.

Referências

- AGOSTONI, C.; HASCHKE, F. Infant formulas: recent developments and new issues. *Minerva Pediatrica*, v. 55, p. 181-94, 2003.
- ANVISA, Ministério da Saúde. Resolução - RDC Nº 45 de 19 de Setembro de 2011.
- BARNES, L. A. History of infant feeding practices. *American Journal Clinical Nutrition*, v. 46, p.168-170, 1987.
- BARROS-FILHO, A. A.; CASTILHO, D. S. The history of infant nutrition. *Jornal de Pediatria*, v. 6, n. 3, p. 179-188, 2010.
- BENATTI, A.; PELUSO, G.; NICOLAI, R.; CALVANI, M. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *Journal of the American College of Nutrition*, v.23, n. 4, p. 281-302, 2004.
- BENSON, J. D.; MASOR, M. L. Infant formula development: past, present and future. *Endocrine Regulations*. v. 28, n. 9, p. 9-16, 1994.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. 1992. A Introdução a Química de Alimentos. Varela, p. 125-162.
- CAMPOS, L. A., FEITOSA, A. R. X., PINHO, L. G., MELO, M. C. A. Fórmulas para lactentes: repercussões na qualidade da nutrição e saúde infantil. *Revista de Pediatria*. v. 9, n. 2, 2008.
- CARVER, J.D. Advances in nutritional modifications of infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.77, p. 1550S-1554S, 2003.
- FOMON, S. J; FILER, L. J.; ANDERSON, T. A; ZIEGLER, E. E. Recommendations for feeding normal infants. *Pediatrics*. v. 63, p. 52-59, 1979.
- GIUGLIANI, E. J. Amamentação: como e por que promover. *Jornal de Pediatria*. v. 3, n. 70, p. 138-151, 1994.
- GRAZIOLA, F.; SOLIS, V. S.; CURI, R., Estrutura Química e Classificação dos Ácidos Graxos. In: Curi, R.; Pompéia, C.; Miyasaka, C.K.; Procópio, J., eds. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manoli, 2002. cap. 2, p.5-24.
- HIRAYAMA, K. B.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES-NETO, U., Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. *The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Disease*, v. 10, n.3, p. 1-10, 2006.

- MONTEIRO R. Norma brasileira de comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância: histórico, limitações e perspectivas. *Revista Panamericana de Saúde Pública*. v. 5, n. 19, p. 70-80, 2006.
- POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manoli, 2002. cap. 34, p.467-488.
- RADBILL, S. X. Infant feeding through ages. *Clinical Pediatrics (Phila)*, n. 20, p. 613.621, 1981.
- REA, M. F. Breast-milk substitutes: past and present. *Revista de Saúde Publica*. v. 3, n. 24, p. 241, 1990.
- ROCHA, H. F. Fórmulas infantis: uma bem vinda revisão de um tema necessário. *Revista de Pediatria*, n. 9, p. 55-56, 2008.
- SILVA, D. R. B.; MIRANDA-JÚNIOR, P. F.; SOARES, E. A. A importância dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa na gestação e lactação. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, v.7, n.2, p. 123-133, 2007.
- STEVENS, E. E.; PATRICK, E.T.; PICKLER, R. A History of Infant Feeding. *The Journal of Perinatal Education*. v. 2, n. 18, 2009.
- VAZ, J. S. et al., Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. *Revista de Nutrição*, v.19, n.4, p. 498-500, 2006.

8.2 Artigo 2 – Artigo Original

Milk protein-based formulas containing different oils affect fatty acids balance in term infants: a randomized blinded crossover clinical trial

Lipids in Health and Disease

Milk protein-based formulas containing different oils affect fatty acids balance in term infants: a randomized blinded crossover clinical trial

Carolina Oliveira de Souza¹, Maria Efigênia Q. Leite², John Lasekan³, Lorena Silva Pinho⁴, Janice Izabel Druzian⁴, Tereza Cristina M. Ribeiro², Ângela P. Mattos², José A. Menezes-Filho⁴, Hugo Costa-Ribeiro^{2*}

¹Postgraduate Programme in Medicine and Health, Federal University of Bahia, Augusto Viana Street, s/n, Canela, Salvador, Bahia, 40110-060, Brazil.

²Fima Lifshitz Research Center at CHUPES, Federal University of Bahia, Augusto Viana Street, s/n, Canela, Salvador, Bahia, 40110-060, Brazil.

³Pediatric Nutrition R&D, Abbott Nutrition, Abbott Laboratories, Cleveland Avenue, Columbus, Ohio, 43215-1724, United States.

⁴College of Pharmacy, Federal University of Bahia, Postgraduate Programme in Food Science, Barão de Jeremoabo Street, s/n, Ondina, Salvador, Bahia, 40170-110, Brazil.

Abstract

Background: Palm olein is used in infant formula fat blends in order to match the fatty acid profile of human milk. While the effects on fatty acid balance have been evaluated, the use of palm olein in combination with palm kernel oil and supplementation with docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA) has not been similarly assessed in infants. This study evaluated the effects of infant formulas containing different fat compositions on the balance of fat, fatty acids, and calcium.

Methods: In this randomized, crossover, double-blinded study, 33 healthy term infants ($68 - 159 \pm 3$ days of age at enrollment) were fed two formulas for 14 days in a tolerance period, followed by a 4-day metabolic balance period in 17 of the male subjects. The study compared two commercially available milk-based powdered formulas in Brazil; the PALM formula contained palm olein (44%), kernel palm oil (21.7%), and canola oil (18.5%) as the predominant fats, whereas the NoPALM formula contained other fat sources.

Results: Fat absorption (%) was greater for NoPALM versus PALM-fed infants (96.55% and 95.50%, respectively; $p = 0.023$). The absorption percentage of palmitic acid (C16:0) did not differ significantly between formulas ($p > 0.05$), but this acid was excreted at significantly higher concentrations in the PALM (29.42 mg/kg/day) than in the NoPALM (12.28 mg/kg/day) formula groups. DHA and ARA absorptions were also higher in NoPALM-fed infants. Calcium absorption was higher in NoPALM-fed infants (58.00%) compared to those fed PALM (40.90%), but the difference was not significant ($p = 0.104$) when calcium intake was used as a covariate. However, calcium retention was higher in NoPALM-fed infants compared to that in PALM-fed infants with or without calcium intake as a covariate. Adverse events did not differ between groups ($p > 0.05$).

Conclusions: The absorption of essential fatty acids was similar for both formulas; however, long-chain polyunsaturated fatty acids (DHA & ARA) were better absorbed from the NoPALM

formula. Fat absorption and calcium retention were lower in term infants fed the PALM-based formula.

Clinical trial registration: Clinicaltrial.gov # (www.clinicaltrials.gov) NCT00941564.

Keywords: Palm olein, Kernel palm oil, Fatty acid balance, Infant formula, Brazilian infants.

Background

During the neonatal period, infants have a high demand for essential nutrients to provide adequate energy supply. In human milk as well as most infant formulas, 50% of the dietary calories are supplied to the newborn as fat, and more than 98% of milk fat is in the form of triglycerides, which contain saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids of varying chain lengths esterified to glycerol [1]. On an energy basis, infant formulas should provide indispensable fatty acids in amounts at least equal to the reference fat (i.e., breast milk), irrespective of source [1, 2, 3].

The blends of vegetable oils used in infant formulas are selected to match the excellent absorption by the infant of breast milk fat, but aside from the absence of long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA), they differ considerably from human milk fat in their fatty acid profiles. Palmitic acid is the major saturated fatty acid in breast milk, accounting for 17-25% of the total [4, 5]. Palm oil and its low melting fraction, palm olein, a relatively inexpensive source of palmitic acid, are added to many infant formulas in amounts that mimic the palmitic acid content of human milk [6]. However, the positional distribution of individual fatty acids on the triacylglyceride molecules, which affects fat absorption, differs between these vegetable oils and human milk fat [7].

Most fatty acids are better absorbed as monoglycerides than as free acids because monoglycerides form mixed micellae with bile acids and cannot form complexes with divalent cations. Fatty acids in the sn-2 position are absorbed as soluble 2-monoacylglycerides, while those in the sn-1 and sn-3 positions are absorbed as free fatty acids [5]. The absorption of free fatty acids varies by structure: monounsaturated (90% of oleic acid (18:1n9) in breast milk, is in the sn-1 or -3 position), polyunsaturated, and saturated fatty acids containing 12 or fewer carbons are all well absorbed. Conversely, sn-2 palmitic monoglyceride is better absorbed than unesterified palmitic acid [5, 8].

In contrast to human milk fat, in which palmitic acid is esterified predominantly in the sn-2 position, palmitic acid is esterified predominantly in the sn-1 and sn-3 positions in vegetable oils added to infant formulas [5, 7]. In the sn-2 position, palmitic acid is generally not hydrolyzed by pancreatic lipase, and the remaining 2-monoacylglycerol is well absorbed [8]. However, palmitic acid in the sn-1 and sn-3 positions is hydrolyzed by pancreatic lipase; the produced free palmitic acid may form calcium–fatty acid complexes, resulting in reduced fat and calcium absorption [6, 8]. These complexes, known as calcium soaps, are insoluble, indigestible, and positively related to stool hardness. The formation of calcium soaps may partly explain the substantial differences in the absorption of nutrients (fat and calcium) and bowel habits between breast- and formula-fed infants [9, 10].

Significant clinical evidence has shown decreased absorption of fatty acids, fat, and calcium by infants fed formulas containing palm olein as the major fat compared to absorption in formulations without palm olein [4, 6, 9, 11, 12]. However, these studies only evaluated palm olein combined with other fats (soy, coconut, high oleic safflower, or sunflower oils) [4, 11, 12, 13]. Previously published data from same participant population as the current study demonstrated that calcium retention was lower in infants fed formulas containing palm oil associated with palm kernel/canola oils and supplemented with LCPUFA (docosahexaenoic acid - DHA and arachidonic acid - ARA) [9]. However, that study did not evaluate the individual balance of fatty acids and their correlation with calcium and fat absorption.

The goal of this study was to assess the comparative individual balance of fatty acids and associate their eventual interference with calcium absorption by normal term infants fed formulas containing distinct blends of fats: one with palm olein, palm kernel oil, and canola oil, and the other with a different oil composition.

Methods

Study design and subjects

This controlled, randomized, double-blinded, crossover balance study tested two formulas in normal infants ($68 - 159 \pm 3$ days of age at enrollment) attending a daycare center in Salvador, Bahia, Brazil. Each feeding period had a 14-day tolerance phase and a four-day metabolic balance phase (Figure 1). The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practices. The protocol was approved by the Institutional Research Board of the Federal University of Bahia, Salvador, Brazil. The parents and/or legal guardians of the infants provided written informed consent. The study was registered at clinicaltrials.gov (#NCT00941564) [9].

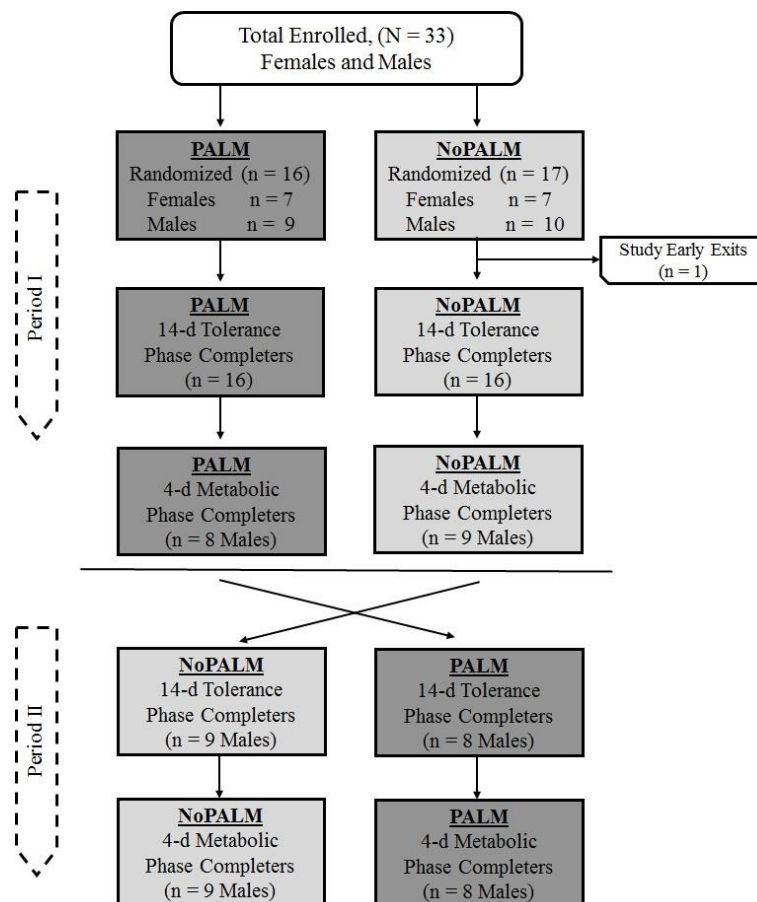


Fig. 1 Study flow diagram of the progress through the periods and study subject dispositions.

Study feedings

The PALM formula, currently marketed under the name NAN PRO1™ (Nestle), includes 44.0% palm oil, 21.7% palm kernel oil, and 18.5% canola oil as the predominant fats and fish oil as a source of DHA. The protein source is whey:casein (70:30). The other formula (NoPALM; Similac Advance™), without olein palm or palm kernel oil, contained 41.4% high oleic sunflower oil, 29.6% coconut oil, and 27.6% soy oil as the major fats, algal oil (*Cryptocodinium cohnii*) as a source of DHA and *M. alpina* oil for ARA . The protein source is 100% whey. The two study formulas contained comparable levels of vitamin D and nutrient levels as recommended by the Brazil Ministry of Health [14] and Codex Alimentarius [15] (Table 1). The study investigators and the subjects' parents were blinded to the dietary allocation. Data analysis was performed with the dietary groups coded, and the code was not broken until all of the analyses were completed [9].

Metabolic balance studies

Using a computer-generated randomization schedule, each infant was randomly assigned to receive one of the paired study formulas as their initial food source and fed for 14 days (tolerance study) before the start of the four-day metabolic balance study (Period I). Following Period I, each infant received the other paired study formula for at least another 14 days prior to the second four-day metabolic balance study (Period II) [9].

Male subjects who completed the first 14-day phase went through the additional four-day metabolic phase assessment in both study periods. Female subjects did not undergo the metabolic assessment to avoid contamination of the stool samples with urine during sample collection. No breast milk supplementation was allowed during the metabolic study [9].

Table 1 Approximate composition of formula products included in this study (per 100 g of powder).

| Nutrient * | PALM | NoPALM | Brazil Human Milk Reference ^a |
|----------------------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------------------------|
| Energy, kcal | 519 | 513 | - |
| Protein, g | 9.5 | 11 | 8.0 |
| Carbohydrate, g | 57.9 | 55 | - |
| Fat, g | 27.7 | 28 | 28.0 |
| Palm olein Oil (%) | 44 | - | - |
| High Oleic Sunflower oil (%) | - | 41.4 | - |
| Palm Kernel Oil (%) | 21.7 | - | - |
| Coconut Oil (%) | - | 29.6 | - |
| Soy Oil (%) | - | 27.6 | - |
| Canola Oil | 18.5 | - | - |
| Corn Oil | 10.9 | - | - |
| Milk Fat | 2.8 | - | - |
| Others | 2.1 ^b | 1.4 ^c | - |
| Fatty Acids (g/100g Fat) ^d | | | |
| 12:0 | 8.30 | 13.22 | 6.88 ± 2.79 |
| 14:0 | 3.17 | 5.26 | 7.02 ± 3.07 |
| 16:0 | 22.61 | 7.46 | 17.30 ± 2.2 |
| 18:0 | 3.42 | 3.11 | 5.30 ± 1.26 |
| 18:1n9 | 43.54 | 47.68 | 25.00 ± 3.46 |
| 18:2n-6 | 15.74 | 20.73 | 20.30 ± 6.48 |
| 18:3n-3 | 1.92 | 1.52 | 1.43 ± 0.66 |
| 20:0 | 0.41 | 0.21 | 0.12 ± 0.03 |
| 20:1n-9 | 0.35 | 0.24 | 0.26 ± 0.06 |
| 20:4n-6 | 0.25 | 0.40 | 0.53 ± 0.14 |
| 22:6n-3 | 0.29 | 0.17 | 0.14 ± 0.05 |
| Minerals | | | |
| Calcium, mg | 279 ^e | 424 ^e | 246.50 |
| Phosphorus, mg | 160 | 216 | 122.60 |
| Magnesium, mg | 36 | 31 | 29.30 |
| Vitamins | | | |
| D, µg | 7.80 | 8.60 | - |

* Values are Manufacturer's Label Claims, except where stated [9].

^a Silva et al. [16]; Braga and Palhares [17].

^b DHA, ARA and Soy lecithin.

^c DHA, and ARA.

^d Analytical values for fatty acids. ^e Investigator's analytical values for calcium.

The metabolic studies with fecal and urine collections were performed over four days and three nights (72 hours). The infants were kept on metabolic beds specially designed to accurately collect separate urine and stool samples [18]. To determine formula intake, the bottles were weighed before and after each feeding. Vomiting and spit-up losses were quantitatively assessed by pre-weighed bibs after feedings. The subjects' weights were measured daily at the hospital by study staff members. The brilliant blue marker method was used to determine completion of intestinal transit of the test formulas [13, 19]. Daily fecal and urine samples were weighed, homogenized, and stored separately in containers at -60°C for further analysis.

Sample Analyses

The total fat content of the formula and feces were extracted with chloroform:methanol (2:1) and quantified by gravimetry as described by Folch et al. [20]. The individual fatty acids were identified by gas chromatography. Aliquots of fat were saponified followed by methylation. Fatty acid methyl esters (FAME) were extracted and stored in an inert atmosphere (N_2) in a freezer at -60°C . Methyl tricosanoate 23:0 (T9900; Sigma Aldrich[®]), was added as an internal standard [21]. The FAME were separated and identified on a gas chromatograph (Varian[®] CP 3800) with a DB-FFAP column ($30\text{ m} \times 0.32\text{ mm} \times 0.25\text{ mm}$) and equipped with a flame ionization detector. The analysis parameters included an injector temperature of 250°C and detector temperature of 280°C . The following thermal program was used: 150°C for 16 min, then increasing by $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 180°C , maintained for 25 min, following an increase of $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 210°C , maintained for 25 min. Helium was used as a carrier gas at 1.0 mL min^{-1} . Nitrogen gas was used as the make-up gas (30 mL min^{-1}); hydrogen gas and synthetic air flows were provided at 30 and 300 mL min^{-1} , respectively. The injections were performed in duplicate for each extraction in a volume of $1\text{ }\mu\text{L}$. FAME were identified by comparing retention times

with known mix standards (189-19; Sigma-Aldrich®). The quantification of fatty acids, expressed in milligrams per gram of lipids, was performed by the addition of an internal standard (23:0). All analyses were conducted in duplicate. As a parameter for the conclusive identification of fatty acids, the samples were injected in a gas chromatograph coupled to a gas chromatography mass spectrophotometer (Clarus 500; Perkin Elmer®). The mass fragments of the samples were compared with the spectral data of the National Institute of Standards and Technology (NIST) standard mass spectral databases and mix standards under the same operating conditions used in the GC/FID at a spectrum of 50–500 m/z (EI, 70 eV).

The study formulas and fecal samples were also separately analyzed for calcium using an atomic absorption spectrophotometer (Model 55B; Varian Medical Systems) after acid digestion. Urine samples were directly analyzed using the atomic absorption spectrophotometer without acid treatment [9].

Data and statistical analyses

Nutrient absorption was calculated as intake minus fecal excretion. Percent absorption was determined by dividing the amount absorbed by the intake amount, multiplied by 100. The primary study variable was calcium absorption calculated from calcium intake and fecal and urinary calcium. The secondary variables included calcium retention, fat absorption, and individual fatty acid absorption. Safety data included adverse events and serious adverse events.

Data were statistically analyzed using STATA 12 (StataCorp, College Station). The interaction between study formula and period (carryover effect) was used to analyze metabolic balance outcomes by analysis of variance (ANOVA). When the carryover effects were significant ($p < 0.10$), only Period I data results were valid. A nonparametric test was used (Wilcoxon Rank Sum) to test the hypothesis of the equality of the observed measurements, with the level of statistical significance set at $p < 0.05$. Partial correlations were determined by

general linear models after adjusting for formula using IBM SPSS Statistics for Windows, version 20.0 (IBM Corp.). Analysis of covariance was utilized in evaluating nutrient (calcium, fat, individual fatty acid) absorption wherever there were significant differences in nutrient intake; using nutrient intake as a covariate. A sample size of 12 subjects (six per sequence A to B and B to A) had an 80% power to detect a difference of at least 15% in calcium absorption, assuming a standard deviation of 7.9%. Approximately eight subjects per sequence were enrolled to account for 25% attrition. In the tolerance phase, a sample size of 20 subjects per group had 80% power to detect a difference of at least 0.55 in mean rank stool consistency.

Results

A total of 33 subjects were enrolled in the study, were randomly assigned to initial formula groups (PALM = 16; NoPALM = 17), and completed the first phase (14-day tolerance study) [9]. One subject receiving NoPALM was hospitalized for a serious adverse event (pneumonia) and exited the study prematurely. Thus, 32 subjects completed the tolerance phase; of these, 17 male infants were fed the assigned study formulas exclusively (no human milk) at the hospital ward (Period II, four days). There were no significant differences ($p > 0.05$) between the two feeding groups in study entry information, adverse events, and other demographic data (Table 2). The age of the study subjects ranged from 68 to 159 days ($p > 0.05$). The intake of formula (PALM and NoPALM) was similar between the groups, without significant differences ($p > 0.05$) (Table 3) [9].

Table 2 Baseline subject information*

| | | Variables | | | | | | |
|-----------------|-------------------------|-----------|------------------------------|----------|------------------|----------|-------------------|----------|
| | Gestational age (weeks) | <i>p</i> | Age at study entrance (days) | <i>P</i> | Birth weight (g) | <i>p</i> | Birth length (cm) | <i>p</i> |
| PALM (n = 16) | 39.8 ± 1.2 | 0.481 | 117 ± 26 | 0.346 | 3333 ± 490 | 0.932 | 49.1 ± 3.7 | 0.965 |
| NoPALM (n = 17) | 39.5 ± 1.1 | | 108 ± 27 | | 3321 ± 330 | | 49.1 ± 1.9 | |

*Values are means ± SD.

Table 3 Intake and excretion of fat, fatty acids, and calcium of infants fed PALM and NoPALM formulas*.

| Variables | PALM (n = 17) | NoPALM (n = 17) |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------|
| FORMULA INTAKE (g/kg/day) | 111.69 (85.30 – 166.92) | 115.88 (69.54 – 144.48) |
| FAT (g/kg/day) | | |
| Intake | 4.62 (3.51 – 7.88) | 4.54 (2.75 – 5.70) |
| Excretion | 0.22 (0.10 – 0.34) | 0.14 (0.03 – 0.44) ^a |
| FATTY ACIDS (mg/kg/day) | | |
| Lauric acid (12:0) | | |
| Intake | 414.68 (324.4– 593.58) | 600.36 (363.92– 752.36) ^b |
| Excretion | 4.08 (1.60 – 5.02) | 1.74 (0.38 – 2.34) ^c |
| Myristic acid (14:0) | | |
| Intake | 159.46 (124.74 – 228.26) | 227.80 (138.08 – 285.48) ^b |
| Excretion | 3.00 (1.18 – 9.56) | 2.80 (0.60 – 6.02) |
| Palmitic acid (16:0) | | |
| Intake | 1177.96 (921.50 – 1686.14) | 320.14 (196.06 – 401.18) ^b |
| Excretion | 29.42 (13.20 – 113.14) | 12.28 (2.86 – 24.74) ^b |
| Stearic acid (18:0) | | |
| Intake | 172.14 (134.66 – 246.40) | 133.22 (80.74 – 166.94) ^b |
| Excretion | 5.40 (2.18 – 18.06) | 7.48 (1.76 – 15.74) |
| Oleic acid (18:1n9) | | |
| Intake | 2471.8 (1932.86 – 3536.70) | 2202.12 (1334.84 – 2759.58) |
| Excretion | 21.86 (11.14 – 73.36) | 21.14 (6.52 – 124.64) |
| Linoleic acid (18:2n6) | | |
| Intake | 825.86 (646.06 – 1182.14) | 930.68 (564.14 – 1166.28) |
| Excretion | 8.18 (4.38 – 20.90) | 5.36 (0.92 – 10.42) ^f |
| Linolenic acid (18:3n3) | | |
| Intake | 96.66 (75.62 – 138.36) | 68.88 (41.76 – 86.32) ^b |
| Excretion | 0.58 (0.32 – 1.78) | 0.18 (0.00 – 0.62) ^g |
| Arachidic acid (20:0) | | |
| Intake | 20.72 (16.20 – 29.64) | 9.64 (5.84 – 12.08) ^b |
| Excretion | 0.48 (0.18 – 1.48) | 0.40 (0.00 – 0.88) |
| Eicosenoic acid (20:1n9) | | |
| Intake | 17.76 (13.90 – 25.44) | 10.90 (6.60 – 13.66) ^b |
| Excretion | 0.48 (0.20 – 1.04) | 0.26 (0.00 – 0.98) ^h |
| Arachidonic acid (20:4n6) | | |
| Intake | 12.44 (9.74 – 17.82) | 18.26 (11.08 – 22.88) ^b |
| Excretion | 0.34 (0.00 – 0.68) | 0.36 (0.00 – 2.24) |
| Behenic acid (22:0) | | |
| Intake | 21.72 (17.00 – 31.12) | 44.72 (27.08 – 56.40) ^b |
| Excretion | 0.56 (0.00 – 2.20) | 1.64 (0.00 – 4.32) ^b |
| Docosahexaenoic acid (22:6n3) | | |
| Intake | 8.34 (7.00 – 12.80) | 7.72 (4.68 – 9.68) ^c |
| Excretion | 1.42 (0.00 – 7.42) | 0.20 (0.00 – 2.72) ⁱ |
| Total Fatty Acids | | |
| Intake | 5388.26 (4215.20 – 7712.82) | 4552.06 (2759.28 – 5704.42) ^d |
| Excretion | 94.36 (52.34 – 251.62) | 61.30 (13.82 – 78.38) ^j |
| CALCIUM (mg/kg/day) | | |
| Intake | 47.20 (35.90 – 70.30) | 73.50 (44.60 – 92.20) ^b |
| Fecal Excretion | 29.01 (9.06 – 49.99) | 30.90 (3.00 – 50.53) |
| Urinary Excretion | 1.62 (0.65 – 3.43) | 1.53 (0.32 – 2.83) |

*Values are median (min ± max). ^b = p<0.001; ^c = p = 0.011; ^d = p = 0.005; ^h = 0.004; ⁱ = 0.011.

^a = Significant carryover effect (p = 0.071); therefore, valid period I significant difference (p = 0.027).

^e = Significant carryover effect (p = 0.016); therefore, valid period I significant difference (p = 0.004).

^f = Significant carryover effect (p = 0.016); therefore, valid period I significant difference (p = 0.043).

^g = Significant carryover effect (p = 0.010); therefore, valid period I significant difference (p = 0.004).

^j = Significant carryover effect (p = 0.032); therefore, valid period I significant difference (p = 0.009).

A significant carryover effect in fecal excretion and absorption of fat was detected ($p = 0.071$ and $p = 0.059$, respectively); consequently, only Period I results were considered valid. In Period I, the stool fat content was significantly lower after NoPALM feeding than that after PALM feeding ($p = 0.027$). The NoPALM feeding group had significantly ($p = 0.020$) higher fat absorption (96.55%) than that of the PALM feeding group (95.50%) (Table 4) [9].

Intake, fecal excretion, and absorption of total fatty acids are summarized in Tables 3 and 4. The total fat intake was similar, but due to the different fatty acid concentrations (distinct sources of vegetable oils) of the evaluated formulas, there were significant differences in the intakes of individual and total fatty acids. When fed the NoPALM formula, the infants ingested significantly higher amount of lauric (12:0), myristic (14:0), arachidonic (20:4n6), and behenic (22:0) acids and significantly lower amount of palmitic (16:0), stearic (18:0), linolenic (18:3n3), arachidic (20:0), eicosenoic (20:1n9), and docosaheptaenoic (22:7n3) acids compared to those fed the PALM formula. The intakes of oleic (18:1n9) and linoleic acid (18:2n6) were not significantly different between the two formulas. As expected, the intake of palmitic acid from the PALM formula (1177.96 mg/kg/day) was higher (about three times) than that of the NoPALM formula (320.14 mg/kg/day) ($p < 0.05$). The intakes of other fatty acids were relatively similar (Table 3).

The fecal excretion of total fatty acids was significantly ($p < 0.05$) higher in the PALM (94.36 mg/kg/day) than in the NoPALM (61.30 mg/kg/day) formulas. Palmitic and oleic acids were excreted at higher concentrations in the infants' feces. The fecal excretions of palmitic and oleic acids were 38.96% and 28.94% in the PALM formula versus 23.16% and 39.87% in the NoPALM formula, respectively (Table 3).

Table 4 Absorption of fat, fatty acids, and calcium of infants fed PALM and NoPALM formulas*.

| Variables | PALM (n = 17) | NoPALM (n = 17) |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------|
| FAT | | |
| Absorbed (g/kg/day) | 4.38 (2.65 – 7.67) | 4.39 (3.39 – 6.56) |
| Absorption (%) | 95.50 (92.50 – 98.00) | 96.55 (90.10 – 99.50) ^a |
| FATTY ACIDS | | |
| Lauric acid (12:0) | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 412.70 (322.58 – 598.64) | 598.72 (363.64 – 751.96) ^b |
| Absorption (%) | 98.89 (97.44 – 99.54) | 99.70 (99.57 – 99.95) ^f |
| Myristic acid (14:0) | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 157.34 (122.86 – 223.18) | 224.42 (135.64 – 284.88) ^b |
| Absorption (%) | 97.65 (93.90 – 98.75) | 98.54 (98.23 – 99.79) ^g |
| Palmitic acid (16:0) | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 1154.38 (898.98 – 1620.56) | 301.88 (183.54 – 398.32) ^b |
| Absorption (%) | 97.56 (90.22 – 98.90) | 95.77 (91.18 – 99.29) |
| Stearic acid (18:0) | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 167.98 (130.90 – 234.68) | 125.10 (75.10 – 165.06) ^b |
| Absorption (%) | 97.01 (89.32 – 98.75) | 94.59 (86.51 – 98.88) |
| Oleic acid (18:1n9) | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 2449.10 (1915.80 – 3480.48) | 2181.60 (1325.88 – 2753.04) ^c |
| Absorption (%) | 98.89 (96.98 – 99.22) | 98.91 (98.28 – 99.76) |
| Linoleic acid (18:2n6) | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 818.44 (642.22 – 1169.44) | 926.72 (562.32 – 1165.36) |
| Absorption (%) | 99.08 (97.42 – 99.37) | 99.46 (98.77 – 99.92) |
| Linolenic acid (18:3n3) | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 96.02 (75.30 – 137.28) | 68.76 (41.58 – 86.24) ^b |
| Absorption (%) | 99.42 (98.13 – 99.60) | 99.68 (99.02 – 100) |
| Arachidic acid (20:0) | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 20.34 (15.90 – 28.44) | 9.22 (5.44 – 11.94) ^b |
| Absorption (%) | 97.53 (92.70 – 99.11) | 95.33 (89.66 – 100) ⁱ |
| Eicosenoic acid (20:1n9) | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 17.44 (13.58 – 24.60) | 10.52 (6.60 – 13.60) ^b |
| Absorption (%) | 97.44 (98.89 – 93.51) | 97.68 (91.45 – 100) |
| Arachidonic acid (20:4n6) | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 12.16 (9.32 – 17.32) | 17.96 (10.96 – 22.76) ^b |
| Absorption (%) | 97.23 (93.86 – 97.64) | 98.09 (96.47 – 99.46) ^b |
| Behenic acid (22:0) | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 10.74 (8.30 – 14.58) | 21.56 (12.94 – 27.72) ^b |
| Absorption (%) | 96.92 (92.88 – 100) | 95.60 (88.94 – 100) |
| Docosahexaenoic acid (22:6n3) | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 7.28 (6.30 – 10.46) | 7.32 (6.56 – 9.68) |
| Absorption (%) | 95.23 (80.06 – 100.00) | 97.44 (66.63 – 100.00) ^l |
| Total Fatty Acids | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 5325.34 (4162.64 – 7552.54) | 4490.86 (2727.24 – 5690.6) ^d |
| Absorption (%) | 97.92 (95.25 – 98.84) | 98.54 (98.23 – 99.76) |
| CALCIUM | | |
| Absorbed (mg/kg/day) | 20.30 (0.10 – 37.10) | 41.30 (25.20 – 92.20) ^b |
| Absorption (%) | 40.90 (0.30 – 74.70) | 58.00 (34.20 – 100.00) ^e |
| Retention (mg/kg/day) | 17.90 (0.60 – 36.40) | 39.60 (23.50 – 90.20) ^b |
| Retention (%) | 38.70 (18.20 – 73.20) | 55.10 (32.00 – 97.80) ^m |

*Values are median (min ± max). ^b = p < 0.001; ^c = p = 0.037; ^d = 0.009; ^e = 0.015, but using calcium intake as covariate yielded p = 0.104; ^l = 0.038; ^m = 0.008.

^a = Significant carryover effect (p = 0.005); therefore, valid period I significant difference (p = 0.020).

^f = Significant carryover effect (p = 0.005); therefore, valid period I significant difference (p = 0.001).

^g = Significant carryover effect (p = 0.028); therefore, valid period I significant difference (p = 0.005).

^h = Significant carryover effect (p = 0.040); therefore, valid period I significant difference (p = 0.021).

The intakes and excretions of ARA and DHA differed between the evaluated formulas. For ARA, intake was significantly higher in the NoPALM formula (18.26 mg/kg/day) ($p < 0.001$) while excretion did not differ between formulas. However, the intake (8.34 mg/kg/day) and excretion (1.42 mg/kg/day) of DHA were greater for the PALM formula ($p < 0.05$) (Table 3).

The intestinal absorption of each individual fatty acid in the 17 infants is shown in Table 4. The absorption of total fatty acids from the PALM formula was less (97.92%) than that of the NoPALM formula (98.54%) ($p > 0.05$). The absorption of the saturated lauric (C12:0) and myristic C14:0 acids significantly better when the infants ingested the NoPALM formula. However, the intestinal absorption of palmitic (C16:0) and stearic (C18:0) acids was not significantly different between the formulas. It is worth noting that the absorption of the 18:2n6 (LA) and 18:3n3 (ALA) essential fatty acids (linoleic acid and α -linolenic acid, respectively) were similar in both groups, but the NoPALM feeding group had a statistically higher absorption of LCPUFA (ARA, $p = 0.021$; DHA, $p = 0.038$) than the PALM feeding group.

Calcium absorption, expressed as mg/kg/day or as percentage, was significantly higher after NoPALM than PALM ingestion ($p < 0.001$ and $p = 0.015$, respectively). Similar results were obtained for calcium retention, in which NoPALM feeding showed higher retention compared to that with PALM feeding ($p < 0.001$). However, when calcium intake was used as a covariate, the difference in calcium absorption was not significant ($p = 0.104$); however, calcium retention remained higher ($p = 0.024$) after ingestion of the NoPALM formula [9].

Significant correlations were observed between fecal calcium excretion and fecal excretion of fat and the major fatty acids. The correlation between the fecal excretions of calcium and fat was significant and showed the highest correlation coefficient for the PALM formula ($r_s = 0.72$, $p = 0.001$) compared to that of the NoPALM formula ($r_s = 0.56$, $p = 0.018$) (Figure 2). The fecal excretions of the major saturated and unsaturated fatty acids were

significantly correlated with total calcium excretion for the PALM formula. The correlations were significant and positive for palmitic acid ($r_s = 0.71$, $p < 0.000$), stearic acid ($r_s = 0.70$, $p = 0.002$), oleic acid ($r_s = 0.66$, $p = 0.003$), and ARA ($r_s = 0.57$, $p = 0.017$). Fatty acids losses were directly and significantly correlated with fat excretion in the PALM formula. Palmitic acid was the major fecal fatty acid in most of the infants, and also showed the highest correlation coefficient ($r_s = 0.85$, $p < 0.000$), followed by stearic ($r_s = 0.75$, $p < 0.000$), oleic ($r_s = 0.67$, $p = 0.003$), and linoleic acids ($r_s = 0.60$, $p = 0.011$).

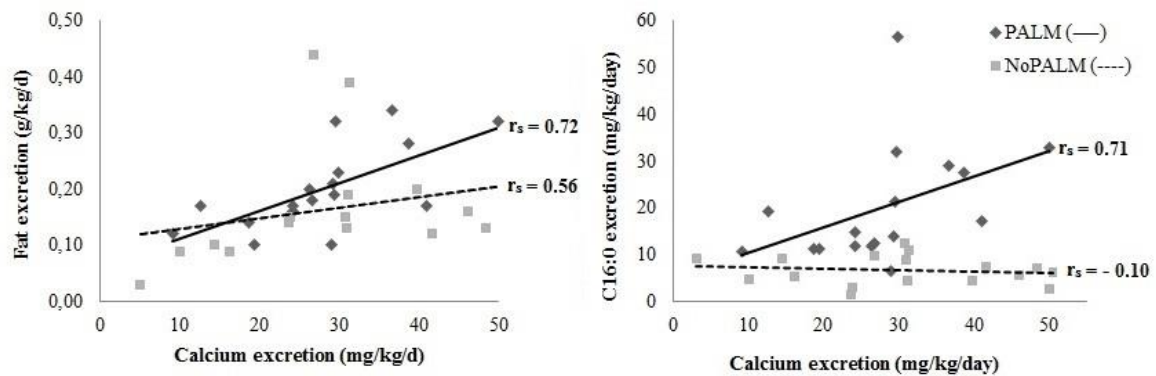


Fig. 2 Correlations between fecal excretions of calcium, fat, and palmitic acid according to formula. r_s - Spearman correlation.

Discussion

The results showed that, although formulas containing a mixture of palm olein, palm kernel oil, and canola oil (PALM) provide proportions of palmitic acid similar to those of human milk fat, they result in significantly lower absorption of fat and retention of calcium by infants compared with a blend of sunflower, coconut, and soy oils (NoPALM) (Tables 1 and 4). Furthermore, we observed different absorption percentages for fatty acids in the formulas examined in this study (Table 4). The results are concordant with those of other studies [4, 9, 12, 13] comparing calcium and fat absorption from palm olein–predominant milk-based formulas versus formulas without palm olein.

Compared to calcium absorption, calcium retention is more accurate markers of functional outcomes for the impact of dietary calcium on calcium homeostasis [9, 22]. Borschel et al. [23] demonstrated a significantly ($p = 0.041$) lower bone mineral content in term infants fed a palm olein containing partially hydrolyzed whey protein-based formula compared to a similar formula containing no palm olein. In another clinical trial, quantitative balance studies were performed to compare calcium absorption in healthy, full term infants fed casein hydrolysate-based and soy protein-based infant formulas with or without palm olein. The infant's calcium absorption was less when fed with casein hydrolysate-based and soy protein-based with palm olein compared to when fed without olein [13].

It is important to highlight that the fat absorptions for both formulas assessed in this study (PALM, 95.50%; NoPALM, 96.55%) were comparable to that of human milk (90.5 - 97.10%) [5, 27]. However, only the NoPALM formula offered calcium absorption and retention (58.00% and 55.10%, respectively) similar to the reported values of breast milk (58.70% and 52.40%, respectively) [24]. An important physiological consequence of reduced calcium bioavailability is the negative effect on bone mass accretion. Moreover, good fat absorption is important for infants because of the high calorie content of fat and its role in brain development [25].

A systematic review of human intervention studies on the effects of infant formulas with the addition of palm olein on bone mineral content and bone mineral density concluded that healthy infants fed a formula containing palm olein as the predominant oil had significantly lower values for both parameters than those fed a formula without olein. The inclusion of this oil in infant formula to provide a fatty acid profile at required levels leads to lower bone mineralization [6].

Infants fed NoPALM in the current study had significantly higher fecal concentrations of oleic, palmitic, and stearic acids versus higher fecal concentrations of palmitic, oleic, and

linoleic acid after PALM formula feeding. Palmitic acid accounted for a large proportion of unabsorbed fatty acids in the PALM formula (38.96%). Studies have reported that infants fed a milk-based formula containing palm olein as a predominant fat have a higher fecal excretion and lower absorption of palmitic acid [4, 11, 12]. In palm olein, the palmitic acid is preferentially esterified at positions sn-1 and sn-3 of the triglyceride molecule. Thus, it is absorbed as a free fatty acid that can bind with calcium in the intestine, forming fatty acid soaps that are excreted fecally, resulting in the low absorption of both nutrients. Moreover, in the intestine, the fatty acid soaps solidify because of their high melting temperature causing hard stools and constipation in the infant. [6, 8, 9, 13].

As previously demonstrated [4, 12], the percentage of palmitic acid absorption was similar for the PALM (97.56%) and NoPALM (95.77%) ($p = 0.094$) formulas (Table 4). Nelson et al. [4] compared the absorption of fatty acids in a group of term infants fed a milk-based formula containing palm olein (45%), soy (20%), coconut (20%), and sunflower (15%) oils with a group fed a formula that contained a blend of safflower, coconut, and soy oils, concluding that the absorption of palmitic acid (91.70%) was better in the formula without palm olein. However, unlike the study of Nelson et al. [4], the PALM formula in the current investigation contained palm kernel oil in addition to palm olein. While palm olein is extracted from the mesocarp of the fruit *Elaeis guineans*, the palm kernel oil is derived from the seed of this fruit and the two have different fatty acid compositions. Palm olein contains 40-42.5% palmitic acid, 9% of which is esterified in the sn-2 position, 9.4-13.52% is already in kernel oil, and 6% is in the sn-2 position [26, 27]. This change in fat composition may influence the fatty acid absorption by infants.

The lauric (C12:0) and myristic (C14:0) saturated fatty acids were significantly ($p < 0.05$) better absorbed by infants fed the NoPALM (99.70% and 98.54%, respectively) formula compared to those fed the PALM (98.89% and 97.65%, respectively) formula. Raiten [1], as in

the Assessment of Nutrient Requirements for Infant Formulas report, did not recommend adding myristic or lauric acids to infant formulas since there are no data to indicate their specific roles as dietary nutrients. However, these fatty acids are components of some oils used in infant formulas, and the author does not proscribe the use of such oils [1]. Since no data are available on which to base a recommendation, the Codex Alimentarius [15] recommends that the maximum levels of lauric and myristic acid in infant formulas not exceed 20% of the total fatty acids. The evaluated formulas had concentrations within these values (PALM, 12.26%; NoPALM, 18.99%) (Table 1). Furthermore, the infants fed both formulas demonstrated absorption percentages of lauric and myristic acid similar to those of infants fed breast milk [5].

The absorption of essential fatty acids (18:2n6 and 18:3n3) were similar for both formulas. However, the absorption of LCPUFA (ARA and DHA) were significantly ($p < 0.05$) greater for the NoPALM formula despite significantly higher DHA intake in the PALM formula (Tables 3 and 4). The values found in this study were superior to those found by Moya et al. [28] and Canielli et al. [29]. However, both of those studies measured the absorption of fatty acids in premature infants, which may explain the lower values. To date, our current study is the first and only study to report the impact of dietary palm olein on the absorption of DHA and ARA in infants. Previous studies on palm olein evaluated infant formulas which were not supplemented with DHA and ARA.

The importance of essential fatty acids, as dietary precursors for eicosanoid and docosanoid formation, has been widely reported. The LCPUFA DHA and ARA are derived from their precursors ALA and LA, respectively. However, ALA and LA cannot be synthesized owing to the lack of the required dietary enzymatic desaturases [30]. DHA and ARA are found in high proportions in the structural lipids of cell membranes, particularly those of the retina and central nervous system, and their accretion primarily occurs during the last trimester of pregnancy and the first year of life [30, 31].

It had previously been assumed that infants could synthesize LCPUFA from essential fatty acids (ALA and LA) through the elongase and desaturase systems. However, evidence that infants fed formula deficient in LCPUFA have a significantly lower plasma or red blood cell levels of DHA and ARA compared with those who were breastfed or fed formula supplemented with LCPUFA suggests that the enzyme systems in infants may be inefficient during the first months of life [32].

In the neonatal period, dietary n-6 and n-3 fatty acid balance is necessary to provide essential polyunsaturated fatty acids for normal growth and development, particularly that of the brain. This ratio is important because both essential fatty acids (ALA and LA) compete for the same enzyme during the synthesis of LCPUFA (DHA and ARA). In this study, both formulas were within the margin of 5:1 and 15:1 suggested by the Codex Alimentarius [15] (PALM, 8:1; NoPALM, 12:1) and the ratio reported in breast milk (10:1) [5, 29].

Supplementation of infant formulas with DHA and ARA for term infants remains controversial. A meta-analysis by Qawasmi et al. [33] concluded that the supplementation of infant formulas with LCPUFA failed to show any significant effect on improving early infant cognition; however, opposite results were reported by Jiao et al. [34]. Another meta-analysis showed that LCPUFA supplementation of infant formulas improves infant visual acuity up to 12 months of age [35]. The European Food Safety Authority concluded from a review of the literature that, although DHA is required for infant formula, ARA is not [36]. However, Crawford et al. [37] do not agree with this opinion and have commented on the recommendations around the need for ARA in infant formulas.

The data presented in this study show that the absorptions of the fatty acids DHA and ARA were as efficient as those from breast milk [29] for the two evaluated formulas. However, absorption (mg/kg/day) and absorption percentages were significantly higher for the NoPALM formula.

Fish and algal oils are the main sources of DHA added to infant formulas. However, unlike in breast milk triacylglycerols, in which DHA is preferentially esterified in the sn-2 position, algal and fish oils do not have a strong positional specificity; rather, there are similar proportions at the sn-1, sn-2, and sn-3 positions [38]. Differences in the molecular structure of the triacylglycerols in these oils may contribute to the differences in digestibility and absorption of these two products [39].

Our results showed that DHA was better absorbed by infants fed the NoPALM formula than those fed the PALM formula. The source of DHA may explain this difference (NoPALM, algal oil; PALM, fish oil) since the intake of this fatty acid was significantly higher with the PALM formula. Clandinin et al. [40] evaluated the benefits of feeding preterm infants formula supplemented with fish and algal oils as a source of DHA. The authors observed an increase in weight and length of infants fed DHA from algal oil but not from fish oil; however, the mechanism for this increase was unclear. Tou et al. [41] also observed the influence of DHA source in digestibility and tissue incorporation of rats fed diets containing different oils.

An association between the fecal excretions of calcium and fatty acids, especially palmitic and stearic acids, was demonstrated for the PALM formula. The increase in calcium excretion was significantly ($p < 0.01$) and directly proportional to the excretions of palmitic and stearic acid in the PALM formula ($r_s = 0.71$ and $r_s = 0.69$, respectively). However, these correlations were inversely proportional but not significant ($p > 0.05$) in the NoPALM formula ($r_s = -0.10$ and $r_s = -0.40$, respectively) (Figure 2). These data reinforce the hypothesis that the excretion and consequent absorption of calcium are closely related to the palmitic acid source in infant formula. The palmitic acid from palm olein is not absorbed efficiently; rather, it forms insoluble calcium soaps in the intestinal tract, rendering a portion of dietary calcium unavailable for absorption. The observation of a high correlation between calcium and palmitic acid

excretion in infants fed formula containing palm olein resulting in low calcium absorption and retention is also supported by other authors [4, 12].

Whether the reduced absorption percentage of fat, fatty acids, and calcium retention caused by the inclusion of palm olein in infant formula is clinically relevant is a matter of perspective. Fecal loss of 0.22 g fat/kg (PALM) and 0.14 g/fat/kg (NoPALM) represents a loss of 9.95 kJ/kg (2.4 kcal) and 6.30 kJ/kg (1.50 kcal), respectively, each day. Normal infants are certainly capable of increasing energy intake proportionately to make up for an energy loss of this magnitude, but preterm infants may have difficulty because of intestinal immaturity. The fecal loss per day can be considered low, but should be taken into consideration during the first year of life when infants are almost exclusively fed formula. As fat provides up to 50% of the total calorie content of most infant formulas, it is important to make allowance for the variations in absorption with different sources of fats. Estimation of caloric intake on the basis of milk composition alone is likely to be confounding effects when fats of different origins are concerned. Similarly, decreased retention of calcium suggests decreased bone mineral deposition. Koo et al. [42] demonstrated that differences in calcium absorption in infants fed formulas with and without palm olein, led to significant differences in bone mineral content at three and six months of age. However, additional long-term studies are necessary to evaluate this influence.

Conclusions

The use of powdered formula that is free of palm olein and palm kernel oil is associated with improved intestinal absorption of the major fatty acids and total fat, as well as calcium retention. The infants showed a similar absorption of essential fatty acids A and ALA; however, the NoPALM-fed infants had higher absorption of LCPUFA (ARA and DHA). Moreover, the DHA source in the NoPALM formula (algal oil) was better absorbed than the source in the

PALM formula (fish oil). Our study illustrates the important general point that differences in formula composition may have a significant effect on the physiologic response of infants. This emphasizes the need for research on the efficacy and safety of new formulations of breast milk substitutes even when they conform to international guidelines for overall nutrient composition. It is important to stress that the findings of our study of Brazilian infants were consistent with those of previous studies on palm olein–predominant formula, despite differences in other fats.

Availability of data and materials

We cannot currently share our data, as they are confidential to our research unit.

For more information about the dataset that supports the conclusions of this article, please contact the corresponding author or the Federal University of Bahia (<http://www.ppgms.ufba.br>).

Abbreviations

ALA: α -linolenic acid; ARA: arachidonic acid; DHA: docosahexaenoic acid; FAME: fatty acid methyl esters; LA: linoleic acid; LCPUFA: long-chain polyunsaturated fatty acids; NoPALM: milk-based powdered commercial formula containing no palm olein; PALM: milk-based powdered commercial formula containing palm olein and palm kernel and canola oils as the predominant fats.

Sources of Funding

Financial support to conduct this study was provided by Abbott Nutrition and Abbott Laboratories. Employees of Abbott Laboratories together with the researchers were responsible for the study design, analysis, and interpretation. The study investigators had the primary

responsibility for data collection, review, and management. The authors declare no associated financial interests.

Competing interests

JL is an employee of Abbott Laboratories. HC received research funding from Abbott Nutrition and other infant formula companies and speaks at programs sponsored by Abbott Nutrition.

Authors' contributions

All authors have contributed to the development and review and have approved the final version of this manuscript. HC is the principal study investigator and senior author. HC, TR, and JL contributed to the study design and participated in every aspect of the study. COS, MEL, LSP, JID, AM, and JAMF conducted the clinical trial, collected and analyzed the data, and wrote the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the clinical study center staff at the daycare center and Fima Lifshitz Research Center at Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, as well as the clinical study groups at Abbott Nutrition, São Paulo, Brazil and Columbus, OH, USA. Lastly, the authors commend the efforts of the parents and infants in Brazil who participated in this clinical trial. COS thanks CAPES for the scholarship.

Authors' information

¹Postgraduate Program in Medicine and Health, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil. ²Fima Lifshitz Research Center at CHUPES, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil. ³Pediatric Nutrition R&D, Abbott Nutrition, Abbott Laboratories, Columbus, Ohio, USA. ⁴College of Pharmacy, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

References

1. Raiten DJ, Talbot JM, Waters JH. Assessment of nutrient requirements for infant formulas. *J Nutr.* 1998;128:2059-94.
2. Gibson RA, Makrides M. n-3 Polyunsaturated fatty acid requirements of term infants. *J Am Coll Nutr.* 2000;71:251-55.
3. Innis SM. Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition. *Adv Nutr.* 2011;2:275-83.
4. Nelson SE, Frantz JA, Ziegler EE. Absorption of fat and calcium by infants fed a milk-based formula containing palm olein. *J Am Coll Nutr.* 1998;17:327-32.
5. Tomarelli RM, Meyer BJ, Weaber JR, Bernhart FW. Effect of positional distribution on the absorption of the fatty acids of human milk and infant formulas. *J Nutr.* 1968;95:583-90.
6. Koo WW, Hockman EM, Dow M. Palm olein in the fat blend of infant formulas: effect on the intestinal absorption of calcium and fat, and bone mineralization. *J Am Coll Nutr.* 2006;25:117-22.
7. Bar-Yoseph F, Lifshitz Y, Cohen T. Review of sn-2 palmitate oil implications for infant health. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013;89:139-43.
8. Innis SM, Dyer R, Nelson CM. Evidence that palmitic acid is absorbed as sn-2 monoacylglycerol from human milk by breast-fed infants. *Lipids.* 1994;29:541-5.
9. Leite ME, Lasekan J, Baggs G, Ribeiro T, Menezes-Filho J, Pontes M, et al. Calcium and fat metabolic balance, and gastrointestinal tolerance in term infants fed milk-based formulas with and without palm olein and palm kernel oils: a randomized blinded crossover study. *BMC Pediatr.* 2013;13:215.

10. Quinlan PT, Lockton S, Irwin J, Lucas AL. The relationship between stool hardness and stool composition in breast- and formula-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1995;20:81-90.
11. Carnielli VP, Luijendijk IH, Van Goudoever JB, Sulkers EJ, Boerlage AA, Degenhart HJ, et al. Structural position and amount of palmitic acid in infant formulas: effects on fat, fatty acid, and mineral balance. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1996;23:553-60.
12. Nelson SE, Rogers RR, Frantz JA, Ziegler EE. Palm olein in infant formula: absorption of fat and minerals by normal infants. *Am J Clin Nutr.* 1996;64:291-6.
13. Ostrom KM, Borschel MW, Westcott JE, Richardson KS, Krebs NF. Lower calcium absorption in infants fed casein hydrolysate- and soy protein-based infant formulas containing palm olein versus formulas without palm olein. *J Am Coll Nutr.* 2002;21:564-9.
14. Brasil. Portaria nº 977, de 5 de dezembro de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, Regulamento técnico referente às fórmulas infantis para lactentes e às fórmulas infantis de seguimento. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil;* 1998. p. 13.
15. Codex Alimentarius Commission. Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants. *CODEX STAN 72-1981.* 2007:19.
16. Silva MHL, Silva MTC, Brandão SCC, Gomes JC, Peternelli LA, Franceschini SCC. Fatty acid composition of mature breast milk in Brazilian women. *Food Chemistry.* 2005;93:297-303.
17. Braga LP, Palhares DB. Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. *J Pediatr (Rio J).* 2007;83:59-63.
18. Callaway CW, Chumlea WC, Bouchard C, Himes JH, Lohman TG, Martin AD, et al. Anthropometric Standardization Reference Manual. In: Lohman TG, Roche AF, R. M, editors. *Anthropometric Standardization Reference Manual;* 1988. p. 177.

19. Fomon SJ. Procedures for collection of urine and feces and for metabolic balance studies. In: Fomon SJ, editor. Nutrition of normal infants. Mosby ed1993. p. 475.
20. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226:497-509.
21. Lopez-Lopez A, Castellote-Bargallo AI, Lopez-Sabater MC. Comparison of two direct methods for the determination of fatty acids in infant feces. *Anal Biochem.* 2000;282:250-5.
22. Guéguen L, Pointillart A. The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr.* 2000;19:119-36.
23. Borschel MW, Groh-Wargo S, Brabec BA, Ziegler EE, Litov RE, Abrams SA, Oliver JS. Tolerance, bone mineral content, and serum vitamin D concentration of term infants fed partially hydrolyzed whey-based infant formula. *Open Nutr. J.* 2012;6:71-9.
24. Hanna FM, Navarrete DA, Hsu FA. Calcium-fatty acid absorption in term infants fed human milk and prepared formulas simulating human milk. *Pediatrics.* 1970;45:216-24.
25. Yao M, Lien EL, Capeding MR, Fitzgerald M, Ramanujam K, Yuhas R, et al. Effects of term infant formulas containing high sn-2 palmitate with and without oligofructose on stool composition, stool characteristics, and bifidogenicity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;59:440-8.
26. Sanders TA, Filippou A, Berry SE, Baumgartner S, Mensink RP. Palmitic acid in the sn-2 position of triacylglycerols acutely influences postprandial lipid metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2011;94:1433-41.
27. D'Agostini D, Gioielli LA. Stereospecific distribution of structured lipids obtained from palm oil, palm kernel oil, and medium chain triacylglycerols. *Rev Bras Cienc Farm.* 2002;38:345-54.

28. Moya M, Cortes E, Juste M, De Dios JG, Vera A. Fatty acid absorption in preterms on formulas with and without long-chain polyunsaturated fatty acids and in terms on formulas without these added. *Eur J Clin Nutr.* 2001;55:755-62.
29. Carnielli VP, Verlato G, Pederzini F, Luijendijk I, Boerlage A, Pedrotti D, et al. Intestinal absorption of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants fed breast milk or formula. *Am J Clin Nutr.* 1998;67:97-103.
30. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 2002;56:365-79.
31. Hoffman DR, Boettcher JA, Diersen-Schade DA. Toward optimizing vision and cognition in term infants by dietary docosahexaenoic and arachidonic acid supplementation: a review of randomized controlled trials. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009;81:151-8.
32. Makrides M, Neumann MA, Simmer K, Gibson RA. Erythrocyte fatty acids of term infants fed either breast milk, standard formula, or formula supplemented with long-chain polyunsaturates. *Lipids.* 1995;30:941-8.
33. Qawasmi A, Landeros-Weisenberger A, Leckman JF, Bloch MH. Meta-analysis of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula and infant cognition. *Pediatrics.* 2012;129:1141-9.
34. Jiao J, Li Q, Chu J, Zeng W, Yang M, Zhu S. Effect of n-3 PUFA supplementation on cognitive function throughout the life span from infancy to old age: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2014;100:1422-36.
35. Qawasmi A, Landeros-Weisenberger A, Bloch MH. Meta-analysis of LCPUFA supplementation of infant formula and visual acuity. *Pediatrics.* 2013;131:262-72.
36. EFSA. Scientific opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. European Food Safety Authority; 2014. p. 106.

37. Crawford MA, Wang Y, Forsyth S, Brenna JT. The European Food Safety Authority recommendation for polyunsaturated fatty acid composition of infant formula overrules breast milk, puts infants at risk, and should be revised. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2015;102:1-3.
38. Martin JC, Bougnoux P, Antoine JM, Lanson M, Couet C. Triacylglycerol structure of human colostrum and mature milk. *Lipids*. 1993;28:637-43.
39. Bottino NR, Vandenburg GA, Reiser R. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. *Lipids*. 1967;2:489-93.
40. Clandinin MT, Van Aerde JE, Merkel KL, Harris CL, Springer MA, Hansen JW, et al. Growth and development of preterm infants fed infant formulas containing docosahexaenoic acid and arachidonic acid. *J Pediatr*. 2005;146:61-8.
44. Tou JC, Altman SN, Gigliotti JC, Benedito VA, Cordonier EL. Different sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids affects apparent digestibility, tissue deposition, and tissue oxidative stability in growing female rats. *Lipids Health Dis*. 2011;10:1-14.
45. Koo WW, Hammami M, Margeson DP, Nwaesei C, Montalto MB, Lasekan JB. Reduced bone mineralization in infants fed palm olein-containing formula: a randomized, double-blinded, prospective trial. *Pediatrics*. 2003;111:1017-23.

9. CONCLUSÕES

- O estudo demonstrou que lactentes a termo saudáveis alimentados com fórmula infantil a base de leite em pó que não continha em sua formulação oleína de palma como fonte de gordura, apresentaram maior absorção e retenção de cálcio, indicando que a utilização dessa fonte de lipídios em fórmulas infantis pode resultar em menor retenção de cálcio com possíveis consequências fisiológicas, uma vez que, a redução da biodisponibilidade desse mineral pode exercer um efeito negativo sobre o metabolismo e desenvolvimento ósseo;
- Devido ao efeito residual (*carryover*) que impossibilitou a avaliação do balanço metabólico da gordura nos dois períodos do estudo, verificou-se na primeira fase, uma absorção percentual de gordura ligeiramente superior para lactentes que receberam fórmula infantil sem adição de oleína de palma. Uma maior absorção de gordura em uma fase da vida de intenso metabolismo, pode representar um diferencial clínico, visto que os lipídios desempenham funções específicas no metabolismo, na absorção de vitaminas, na estruturação de membranas, dentre outras;
- As blendas de óleos vegetais utilizadas como fonte de gordura nas fórmulas infantis, resultaram em diferentes absorções de ácidos graxos pelos infantes. As crianças apresentaram absorção similar de ácidos graxos essenciais e ácido palmítico, no entanto, a fonte de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa da fórmula sem oleína de palma (óleo de alga) foi melhor assimilada, apresentando os maiores percentuais de absorção.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apontam para o fato que diferenças na composição de gordura em fórmulas infantis podem exercer efeito significativo sobre as respostas fisiológicas de lactentes saudáveis, sendo a seleção adequada de lipídios para utilização em fórmulas um fator consideravelmente importante para a saúde e desenvolvimento. Isso enfatiza a necessidade de pesquisa sobre a eficácia e segurança de novas formulações de substitutos do leite materno, mesmo quando estes estejam em conformidade com as diretrizes internacionais para composição global de nutrientes. Os estudos são necessários a fim de estabelecer as melhores composições de macro e micronutrientes que favoreçam a adequada performance nutricional do indivíduo em fases precoces e que poderão ter repercussões ao longo da vida. É importante salientar que as conclusões do estudo com crianças brasileiras foram consistentes com os resultados de estudos anteriores sobre a influência negativa da oleína de palma no balanço metabólico de cálcio, gordura e ácidos graxos.

11. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO

A fim de se evitar o efeito residual *carryover* observado nessa pesquisa, são necessárias novas investigações que contemplem em seu desenho de estudo um maior intervalo de tempo no período crossover, para que o efeito de transição possa ser anulado, permitindo assim, a análise comparativa dos diferentes grupos de consumo de fórmulas infantis nos dois períodos propostos.

O tamanho amostral foi estabelecido para demonstrar diferenças estatisticamente significantes nas variáveis primárias, se faz necessário, em um estudo futuro redimensionar o tamanho amostral para que possamos confirmar o impacto das respostas observadas.

O estudo comparou os dados do balanço metabólico de cálcio, gordura e ácidos graxos dos lactentes alimentados com fórmulas infantis com dados de lactentes alimentados com leite materno (literatura). Para uma melhor avaliação e comparação dos resultados, sugere-se em uma futura pesquisa a inserção de um grupo com amamentação exclusiva como grupo referência.

12. ANEXOS

12.1 Anexo A – Carta de Aceite do Artigo Original

View Letter

Close

Date: 01 Aug 2016
To: "Carolina Oliveira Souza" carolinaods@hotmail.com
From: "Lipids in Health and Disease Editorial Office" lipidworld@biomedcentral.com
Subject: Your submission to Lipids in Health and Disease - LHAD-D-16-00193

LHAD-D-16-00193

Formula milk containing different vegetables oils affect fatty acids balance in term infants: a randomized blinded crossover clinical trial

Carolina Oliveira Souza, MsC.; Maria Efigênia Leite, PhD; John Lasekan; Lorena Silva Pinho, MsC.; Janice Izabel Druzian, PhD; Tereza Cristina Ribeiro, PhD; Angela P Mattos, PhD; José A Menezes-Filho, PhD; Hugo Costa-Ribeiro, PhD

Lipids in Health and Disease

Dear Mrs Souza,

Your manuscript "Formula milk containing different vegetables oils affect fatty acids balance in term infants: a randomized blinded crossover clinical trial" (LHAD-D-16-00193) has been assessed by our reviewers. Although it is of interest, we are unable to consider it for publication in its current form. The reviewers have raised a number of points which we believe would improve the manuscript and may allow a revised version to be published in Lipids in Health and Disease.

Their reports, together with any other comments, are below. Please also take a moment to check our website at <http://lhad.edmgr.com/> for any additional comments that were saved as attachments.

12.2 Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ ESCLARECIDO

TÍTULO: Comparação da Absorção de Cálcio e Tolerância
Gastrintestinal em Bebês Saudáveis Alimentados com
Fórmulas Lácteas com Diferentes Misturas de Gordura

PATROCINADOR: Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.
Rua Michigan, 735, Brooklin
São Paulo – SP, Brasil
CEP 04566-905

Nº. DO PROTOCOLO: AK76

INVESTIGADOR: Hugo da Costa Ribeiro Jr.

TELEFONE: 71-33312027

INTRODUÇÃO

Convidamos você e seu filho(a) para participarem deste estudo de pesquisa. Antes de concordar em participar deste estudo de pesquisa, é importante que você leia e entenda a explicação dos procedimentos propostos a seguir. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e precauções do estudo. Ela também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis a você e seu direito de descontinuar o estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou certeza podem ser feitas com relação aos resultados do estudo.

Se você não for completamente honesto com seu médico do estudo a respeito de seu histórico de saúde, você poderá sofrer danos ao participar do estudo.

Este estudo está sendo conduzido pela Abbott Laboratórios do Brasil Ltda. O médico do estudo está sendo pago pela Abbott Laboratórios do Brasil Ltda. para conduzir este estudo. Você poderá fazer qualquer pergunta a qualquer momento para se assegurar de que sua decisão em participar do estudo não seja de forma alguma influenciada para que seu filho(a) participe neste estudo de pesquisa. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo de pesquisa é descobrir como bebês saudáveis lidam com o cálcio e a gordura de duas fórmulas lácteas em pó disponíveis comercialmente no Brasil e também descobrir como esses bebês toleram as fórmulas. Além disso, será perguntado aos pais sobre sua satisfação com as fórmulas.

Perguntamos se você gostaria que seu bebê participasse deste estudo de pesquisa porque seu bebê:

é um bebê saudável
nascido a termo
tem entre 84 e 156 dias de idade
alimentado principalmente por fórmula

Caso concorde em deixar que seu bebê participe deste estudo, você não deverá fornecer ao seu bebê nenhum dos itens da lista abaixo enquanto ele estiver no estudo, a menos que o médico lhe dê outras instruções:

fórmulas que não sejam as do estudo
medicações para gases (incluindo Luftal®)
remédios caseiros para constipação (incluindo suco)
preparações com ervas (incluindo chá de camomila)
probióticos (incluindo Floratil®, Lactipan®, Florax®, etc)
reidratação/líquidos IV (na veia)
alimentos sólidos, sucos e outras fontes de nutrição
suplementos vitamínicos ou minerais

NÚMERO DE PARTICIPANTES/ DURAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO

Aproximadamente 40 crianças de creches em Salvador, Bahia, Brasil, participarão deste estudo.

A participação de seu bebê neste estudo durará aproximadamente 14 dias, caso ele/ela participe apenas da primeira fase de tolerância do estudo. Fases adicionais do estudo incluem uma fase metabólica de 4 dias, uma segunda fase de tolerância de 14 dias e uma segunda fase metabólica de 4 dias. Caso seu bebê seja elegível para todas as fases do estudo e você decida permitir que seu bebê participe de todas as fases, a participação do seu bebê durará aproximadamente 40 dias. Em aproximadamente 7 a 10 dias após o último dia do estudo de seu bebê, a equipe do estudo contatará você por telefone para obter informações de acompanhamento.

PRODUTOS EM ESTUDO

Os produtos em estudo são duas fórmulas lácteas em pó para bebês disponíveis comercialmente. As duas fórmulas oferecem nutrição completa e devem ser utilizadas como a principal fonte de nutrição durante a participação de seu bebê no estudo. Suplementação ocasional com amamentação em casa (fora da creche) durante as fases de tolerância do estudo é permitida se você concordar em pesar e registrar o peso de seu bebê antes e depois da amamentação. Se seu bebê participa de todas as

fases do estudo, ele/ela poderá consumir apenas as fórmulas em estudo durante as fases metabólicas do estudo. Não será permitida suplementação com leite materno durante as fases metabólicas.

Uma das fórmulas em estudo contém oleína de palma (gordura extraída do óleo de palma) como a principal fonte de gordura. A outra fórmula em estudo não contém oleína de palma. A oleína de palma é incluída em muitas fórmulas infantis para imitar a quantidade de gordura no leite humano. Outras fórmulas infantis contêm todas as combinações de gorduras vegetais sem a oleína de palma. O tipo de gordura presente nas fórmulas infantis pode afetar a boa absorção de gorduras e cálcio pelos bebês e a forma como eles toleram as fórmulas. O teor nutricional de cada uma dessas fórmulas atende a *Nutritional Labeling and Education Guidelines* [Diretrizes para Educação e Rotulagem Nutricional] (NLEA) conforme estabelecido pela Agência de Controle de Medicamentos e Alimentos norte-americana (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde Brasileiro.

A fórmula em estudo que seu bebê receberá, será designada aleatoriamente (como jogar cara/coroa). Seu bebê terá chances iguais de receber uma das fórmulas em estudo. Caso seu bebê participe de todas as fases do estudo, ele/ela terá a fórmula em estudo trocada para a outra fórmula após a conclusão da primeira fase metabólica do estudo. Nem você, nem a equipe do estudo saberão qual fórmula seu bebê receberá. Esta informação estará disponível apenas para o médico do estudo, caso seja necessário em uma emergência.

PROCEDIMENTOS

Você e seu bebê terão visitas do estudo diárias na creche, durante os dias de semana na primeira fase de tolerância de quatorze dias do estudo (Dias 1 – 14 do Estudo). Seu Dia 1 do Estudo durará aproximadamente 30 – 60 minutos. Os dias posteriores das visitas do estudo na creche durarão aproximadamente 15 – 30 minutos. O Dia 14 do Estudo será o último dia do estudo se seu bebê não estiver participando da fase metabólica do estudo e a duração total da participação de seu bebê será de aproximadamente 14 dias.

Caso seu bebê seja elegível para participar da fase metabólica do estudo, assim que completar a primeira fase de tolerância de quatorze dias, ele será internado na Ala Metabólica da Unidade Metabólica Fima Lifshitz, no Centro Pediátrico Prof. Hosannah de Oliveira do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil, onde ficará por 4 dias para participar da primeira fase metabólica do estudo (Dias 15 – 18 do Estudo). Bebês elegíveis incluem aqueles do sexo masculino que completem com sucesso os primeiros 14 dias do estudo e que não usem qualquer antibiótico, suplementos vitamínicos/minerais ou probióticos nos 3 dias imediatamente anteriores à fase metabólica. Assim que

completar a fase metabólica, seu bebê retornará para casa. Em seguida, seu bebê participará da segunda fase de tolerância de quatorze dias do estudo (Dias B1 – B14 do Estudo) e você e seu bebê terão novamente visitas diárias do estudo na creche durante os dias de semana. Finalmente, se seu bebê ainda for elegível, ele será internado novamente na Ala Metabólica do Hospital Professor Edgar Santos, onde ficará por 4 dias para participar da segunda fase metabólica do estudo (Dias B15 – B18 do Estudo). O Dia B18 do Estudo será o último dia do estudo. Poderá haver intervalos de 2 a 3 dias entre as fases do estudo devido aos finais de semana e feriados. Nesse caso, você será orientado a continuar alimentando o bebê com a fórmula em estudo designada durante esses intervalos. A duração total da participação de seu bebê em todas as quatro fases do estudo será de aproximadamente 38 – 40 dias.

A equipe do estudo poderá ligar para você entre as visitas para ver como está seu bebê, lembrá-lo das visitas do estudo e de continuar com o registro em casa, e para esclarecer as informações que você tenha fornecido anteriormente. Você também receberá uma chamada telefônica de acompanhamento em 7 a 10 dias após o último dia do estudo se seu bebê apresentar um evento médico em andamento no último dia do estudo.

Visita do Dia 1 do Estudo

Esta visita ocorrerá quando seu bebê tiver 84 a 156 dias de idade. Será solicitado que você leia, discuta, assine e date este termo de consentimento antes que qualquer procedimento do estudo seja realizado. Os seguintes procedimentos e avaliações serão realizados na creche:

Você deverá fornecer informações iniciais sobre o sexo, raça, etnia, idade gestacional, histórico médico, peso no nascimento, comprimento no nascimento, circunferência da cabeça no nascimento, tipo de parto e consumo alimentar antes do estudo.

O peso, comprimento e circunferência da cabeça de seu bebê serão medidos.

Seu bebê será designado aleatoriamente (como jogar cara/coroa) para receber uma das fórmulas em estudo.

Seu bebê começará a consumir a fórmula em estudo designada, conforme preparação na creche pela equipe do estudo.

A equipe do estudo medirá e registrará o número, consistência e cor das fezes e o consumo diários, a incidência de rejeição (cuspe) e vômito associados à alimentação e a ocorrência de irritação e gases de seu bebê.

A equipe do estudo revisará as instruções para misturar, armazenar e administrar a fórmula antes de liberar seu bebê para passar a noite em casa. Você receberá instruções por escrito também.

Você receberá a fórmula em estudo em quantidade suficiente para alimentar seu bebê em casa até a chegada à creche no dia seguinte. Você receberá o pó da fórmula em estudo pré-medida em frascos transparentes com indicação de volume e água limpa e potável engarrafada.

Em casa, você preencherá os registros de consumo e fezes diários. Você registrará o consumo da fórmula, o número, consistência e cor das fezes, a incidência de rejeição (cuspe) e vômito associados à alimentação e a ocorrência de irritação e gases.

Em casa, você alimentará o bebê com a fórmula em estudo como principal fonte de alimentação. Caso amamente ocasionalmente, você pesará seu bebê antes e depois de cada amamentação. Você registrará esses pesos e o número de amamentações em um formulário fornecido pela equipe do estudo para você. Você receberá uma balança e será treinada sobre como usá-la.

Visitas dos Dias 2 a 13 do Estudo

Nos Dias 2 a 13 do Estudo, os seguintes procedimentos e avaliações serão realizados:

Você devolverá os registros do consumo e fezes diários e os registros de quaisquer pesos e suplementação que tenha preenchido em casa desde a última visita do estudo.

A equipe do estudo revisará os registros de consumo e fezes completos com você para garantir que eles estejam corretos, legíveis e completos.

Caso tenha amamentado ocasionalmente seu bebê, a equipe do estudo também revisará seus registros de peso e suplementação preenchidos com você para garantir que eles estejam corretos, legíveis e completos.

Você receberá um novo treinamento, conforme necessário, sobre o preenchimento dos registros de consumo, fezes, peso e suplementação. Você continuará a preencher esses registros até o Dia 14 do Estudo.

Será perguntado a você sobre a experiência de seu bebê em casa desde o último dia na creche, incluindo os seguintes itens:

houve alguma mudança na saúde de seu bebê?

seu bebê consumiu alguma fórmula que não seja a fórmula em estudo?

seu bebê foi amamentado?

seu bebê usou alguma medicação, suplementos vitamínicos/minerais, remédios caseiros, preparações com ervas, probióticos, reidratação/ líquidos IV, alimentos, sucos ou outras fontes de nutrição?

O peso de seu bebê será medido pela equipe do estudo na creche, exceto nos finais de semana e feriados.

Enquanto seu bebê estiver na creche, ele será alimentado somente com a fórmula em estudo designada, conforme preparação pela equipe do estudo.

Enquanto seu bebê estiver na creche, a equipe do estudo medirá e registrará o número, consistência e cor das fezes e o consumo diários, a incidência de rejeição (cuspe) e vômito associados à alimentação e a ocorrência de irritação e gases.

A equipe do estudo revisará as instruções para administração da fórmula antes de liberar seu bebê para passar a noite em casa.

Você receberá a fórmula em estudo em quantidade suficiente para alimentar seu bebê em casa até a chegada à creche no dia seguinte. Você receberá o pó da fórmula

em estudo pré-medida em frascos transparentes com indicação de volume e água limpa e potável engarrafada com instruções claras sobre como misturar, armazenar e administrar a fórmula.

Em casa, você alimentará o bebê com a fórmula em estudo como principal fonte de alimentação. Caso você amamente ocasionalmente, você pesará seu bebê antes e depois de cada amamentação. Você registrará esses pesos e o número de amamentações em um formulário fornecido pela equipe do estudo para você.

Visita do Dia 14 do Estudo

O Dia 14 do Estudo é o último dia do estudo para bebês que não participam das próximas fases do estudo. No Dia 14 do Estudo, os seguintes procedimentos e avaliações serão realizados:

Você devolverá os registros do consumo e fezes diários e os registros de quaisquer pesos e suplementação que tenha preenchido em casa desde a visita anterior do estudo.

A equipe do estudo revisará os registros de consumo e fezes completos com você para garantir que eles estejam corretos, legíveis e completos.

Caso tenha amamentado ocasionalmente seu bebê, a equipe do estudo também revisará seus registros de peso e suplementação completos com você para garantir que eles estejam corretos, legíveis e completos.

Você preencherá o Questionário de Satisfação da Fórmula.

O peso, comprimento e circunferência da cabeça de seu bebê serão medidos pela equipe do estudo.

Será perguntado a você sobre a experiência de seu bebê em casa desde o último dia na creche, incluindo os seguintes:

Houve alguma mudança na saúde de seu bebê?

Seu bebê consumiu alguma fórmula que não seja a fórmula em estudo?

Seu bebê foi amamentado?

Seu bebê usou alguma medicação, suplementos vitamínicos/minerais, remédios caseiros, preparações com ervas, probióticos, reidratação/ líquidos IV, alimentos, sucos ou outras fontes de nutrição?

Se este for o último dia do estudo de seu bebê e ele/ela apresentar algum evento médico em andamento, você receberá um telefonema de acompanhamento em 7 a 10 dias para determinar o desfecho do evento médico.

Caso seu bebê seja elegível para continuar na fase metabólica do estudo, você receberá a fórmula em estudo em quantidade suficiente para alimentá-lo em casa até o Dia 15 do Estudo, quando ele será internado na Ala Metabólica da Unidade Metabólica de Fima Lifshitz, do Centro Pediátrico Prof. Hosannah de Oliveira do Complexo Universitário Professor Edgar Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. Você receberá o pó da fórmula em estudo pré-medida em frascos transparentes com indicação de volume e água limpa e potável engarrafada com instruções claras sobre como misturar, armazenar e administrar a fórmula.

Você continuará a preencher os registros de consumo e fezes diários, e registros de peso e suplementação diários caso ele seja amamentado, até que seu bebê chegue à Ala Metabólica.

Visita a Ala Metabólica dos Dias 15 a 18 do Estudo

No Dia 15 do Estudo, caso seu bebê seja elegível, ele será internado na Ala Metabólica, onde ele permanecerá em uma cama metabólica especial por 4 dias e 3 noites. A cama metabólica é especialmente desenhada para coletar amostras de urina e fezes. Os seguintes procedimentos e avaliações serão realizados :

Assim que chegar na ala metabólica e, novamente, 72 horas depois, seu bebê receberá marcador fecal azul brilhante em aproximadamente 62,2 gramas da fórmula em estudo.

Seu bebê será alimentado exclusivamente com a fórmula em estudo até receber alta da ala no Dia 18 do Estudo. Nenhuma suplementação com leite materno ou alimentos sólidos ou sucos será permitida.

A equipe do estudo preencherá os registros de consumo e fezes diários de seu bebê. Seu bebê será pesado diariamente.

As fezes de seu bebê serão coletadas e, então, analisadas quanto ao teor de gordura e cálcio.

Seu bebê terá alta da ala metabólica assim que completar o estudo metabólico no Dia 18 do Estudo.

A fórmula em estudo de seu bebê será, então, trocada para a outra fórmula. Você receberá a fórmula em estudo em quantidade suficiente para alimentar seu bebê em casa até o Dia B1 do Estudo (início da segunda fase de tolerância). Você receberá o pó da fórmula em estudo pré-medida em garrafas transparentes com indicação de volume, água limpa e potável engarrafada com instruções claras sobre como misturar, armazenar e administrar a fórmula. Você preencherá os registros de consumo e fezes diários e registros do peso e suplementação, caso tenha amamentado, até que seu bebê inicie a segunda fase de tolerância no Dia B1 do Estudo na creche.

Dias B1 a B18 do Estudo

Seu bebê irá repetir todas as visitas e procedimentos descritos acima para os Dias 1 a 18 do Estudo enquanto estiver consumindo a outra fórmula em estudo entregue a você no Dia 18 do Estudo. Os Dias B1 – B14 do Estudo serão a segunda fase de tolerância. Os Dias B15 – B18 do Estudo serão a segunda fase metabólica. Assim que tiver alta da Ala Metabólica no Dia B18 do Estudo, seu bebê deixará o estudo. Caso seu bebê apresente um evento médico em andamento no Dia B18 do Estudo, você receberá um telefonema de acompanhamento em 7 a 10 dias para determinar o desfecho do evento médico.

RISCOS E DESCONFORTOS

Existem certos riscos associados à participação neste estudo. Seu bebê poderá não aceitar a fórmula em estudo. Sinais de que seu bebê não consegue aceitar a fórmula em estudo são constipação, diarreia, gases, irritação, rejeição (cuspe), vômito, intolerância e recusa em beber a fórmula em estudo. Seu bebê poderá chorar ou ficar irritado quando for internado na Ala Metabólica pois se trata de um lugar estranho para ele. As chances de seu bebê apresentar uma reação ao marcador fecal azul brilhante são quase nulas, já que é um produto de grau alimentício.

Somente o paciente em estudo deverá receber a fórmula em estudo. Ela deverá ser mantida fora do alcance de crianças e pessoas que possam não ser capazes de ler e entender as instruções do estudo.

Caso seu bebê apresente qualquer problema com a fórmula em estudo, contate o médico ou a equipe do estudo assim que possível.

RISCOS NÃO PREVISTOS

Podem existir riscos não conhecidos ao participar deste estudo, inclusive uma reação alérgica, que se não for tratada imediatamente, pode ser uma ameaça à vida.

NOVOS ACHADOS

Você será informado em um momento oportuno, caso novas informações que possam ser relevantes ao seu desejo em continuar a permitir que seu bebê participe deste estudo estiverem disponíveis.

BENEFÍCIOS

Não se espera que seu bebê receba qualquer benefício médico direto por sua participação no estudo. Os resultados deste estudo podem beneficiar outros no futuro.

TRATAMENTOS ALTERNATIVOS

Este estudo é voltado apenas para a pesquisa. Sua alternativa é não participar neste estudo. Caso decida que você não quer que seu filho participe deste estudo, outras fórmulas infantis padrão estão disponíveis.

COMPENSAÇÃO POR LESÃO

Se seu bebê sofrer uma lesão como resultado direto de sua participação neste estudo, contate imediatamente o médico do estudo, Dr. Hugo da Costa Ribeiro Jr. O médico do estudo revisará a situação. Se necessário, o médico do estudo fornecerá tratamento ou

encaminhará seu bebê para tratamento.

Caso o médico do estudo determinar que uma complicação, lesão ou doença exigindo tratamento médico de emergência é resultado da participação deste estudo, será fornecido tratamento médico apropriado sem nenhum custo a você. A Abbott concorda em pagar todas as despesas médicas razoáveis necessárias para tratar tal lesão;

desde que você não seja ressarcido de outra forma pelo seguro de saúde, e desde que você tenha seguido todas as instruções do médico e/ou equipe do estudo.

Este acordo para fornecer tratamento médico não inclui complicações, lesões ou doenças que seu bebê possa ter adquirido enquanto ele/ela estava no estudo se essas complicações não forem resultado da fórmula em estudo. Não há planos para pagamento adicional por perdas salariais, dor e sofrimento, ou por outras perdas.

Ao assinar este termo de consentimento, você não abre mão de qualquer direito de seu bebê.

CUSTOS

Não haverá custos para você por sua participação neste estudo. As fórmulas do estudo, visitas e procedimentos do estudo serão fornecidos sem nenhum custo a você ou seu plano de saúde. Você será cobrado por todo tratamento médico que não seja parte do estudo. Esses podem incluir aqueles relacionados ao tratamento médico de seu bebê (taxas hospitalares e médicas) que não são parte deste estudo.

CONFIDENCIALIDADE

Os registros da participação de seu bebê no estudo serão mantidos em sigilo, salvo se a divulgação for exigida pela lei ou conforme descrito neste termo de consentimento livre e esclarecido (em "Confidencialidade" ou "Autorização para Uso e Divulgação de Informações de Saúde Protegidas"). O médico do estudo, o patrocinador ou as pessoas que trabalham em nome do patrocinador e em circunstâncias especiais, a Agência de Controle de Alimentos e Medicamentos norte-americana (FDA) e o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) poderão inspecionar e fazer cópias dos registros sigilosos relacionados ao estudo que identifiquem você e seu bebê pelo nome. Portanto, não se pode garantir sigilo absoluto. Caso os resultados deste estudo sejam publicados ou apresentados em reuniões, você não será identificado.

COMPENSAÇÃO PELA PARTICIPAÇÃO

Nenhum tipo de compensação financeira será fornecido a você. A fórmula em estudo será fornecida gratuitamente ao seu filho enquanto ele estiver participando do estudo. _____

CONTATO DE EMERGÊNCIA / CONTATO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Caso tenha alguma pergunta sobre este estudo ou sobre a participação de seu bebê neste estudo, ou se você achar que seu bebê possa ter apresentado uma lesão relacionada à pesquisa ou uma reação à fórmula em estudo, contate o médico do estudo, Dr. Hugo da Costa Ribeiro, Jr, no número relacionado na página 1 deste documento.

Caso tenha alguma pergunta sobre os direitos de seu bebê como participante da pesquisa ou reclamações a respeito deste estudo de pesquisa, você deverá ligar ou escrever para o Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira, 55-71-32838043, de segunda a sexta-feira das 8:00 às 12:00 e das 14:00 às 18:00.

PARTICIPAÇÃO / RETIRADA VOLUNTÁRIA

Sua decisão em permitir que seu bebê participe deste estudo é voluntária. Você pode escolher não permitir que seu filho participe ou você poderá retirar seu filho do estudo por qualquer motivo, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais seu bebê teria direito de outra forma e sem qualquer efeito no tratamento médico futuro de seu bebê.

O médico do estudo ou o patrocinador poderá interromper a participação de seu bebê no estudo a qualquer momento sem o seu consentimento por qualquer um dos seguintes motivos:

- o médico do estudo acha que é necessário para a segurança e saúde do seu bebê; você não seguiu as instruções do estudo;
- o patrocinador interrompeu o estudo;
- seu bebê não atende mais às exigências de qualificação;
- você não consente mais com qualquer alteração futura que possa ser feita ao estudo;
- motivos administrativos exigem a retirada de seu bebê;
- o número desejado de participantes já foi alcançado neste estudo; ou
- outros motivos.

Se retirar seu bebê do estudo antes da visita final programada, então, o médico do estudo pedirá que seja feita uma visita final com seu bebê para que sejam feitos os procedimentos do final do estudo e devolução de toda a fórmula em estudo não utilizada.

A participação neste estudo não deve substituir o tratamento médico de rotina pelo médico principal que presta cuidados ao seu bebê.

INFORMAÇÕES COM RELAÇÃO AO ACESSO A INFORMAÇÕES DE SAÚDE PESSOAIS DE SEU BEBÊ A PARTIR DE SEUS REGISTROS MÉDICOS

As informações de saúde pessoais de seu bebê a partir de seus registros médicos e/ou registros do estudo serão coletados neste estudo. Elas serão usadas para pesquisa clínica e também para buscar aprovação de autoridades regulatórias nacionais e/ou estrangeiras para comercializar a fórmula em estudo. Elas também poderão ser usadas em relatórios de estudo ou em apresentações científicas, no entanto, tais relatórios e publicações não identificarão seu bebê pelo nome. As informações pessoais deste estudo sobre seu bebê também poderão ser usadas em pesquisas médicas futuras.

Registros que identifiquem você ou seu bebê serão mantidos em sigilo, salvo na medida acordada mutuamente com esta autorização e na medida permitida pelas leis e/ou regulamentos aplicáveis, os resultados publicados não identificarão os pacientes do estudo pelo nome.

Assinando este termo, você autoriza o investigador e a equipe do estudo a permitir que a Abbott, suas empresas afiliadas ou empresas independentes monitorem o estudo e os resultados das auditorias em nome da Abbott, para acessar os registros médicos originais de seu bebê com o objetivo de coletar dados, verificar se os dados estão corretos e verificar se o estudo está sendo conduzido de forma apropriada, na medida permitida pela lei em vigor. Além disso, a Abbott, suas empresas afiliadas e outras empresas que trabalhem com a Abbott, o investigador e a equipe do estudo, o(s) comitê(s) de ética e autoridades regulatórias nacionais e estrangeiras responsáveis pela vigilância de estudos de pesquisa terão acesso aos registros médicos de seu bebê por meio de um formulário que não mencione o nome de seu bebê para completar a pesquisa, incluindo a coleta, processamento, análise, uso e armazenamento de dados. Algumas dessas organizações podem estar localizadas em outros países, inclusive nos Estados Unidos. Outros países podem não ter leis que protejam a privacidade de seu bebê na mesma medida que as leis de seu país, mas a Abbott tomará medidas razoáveis para proteger a privacidade de seu bebê. As informações coletadas como parte do estudo podem ser transferidas a essas organizações por meio de um computador.

Você poderá ser retirado do estudo a qualquer momento. Caso seja retirado do estudo, os dados obtidos antes de sua retirada ainda poderão ser usados após a sua retirada na medida permitida pela lei em vigor, mas nenhum dado novo será coletado após sua retirada do estudo.

Você tem o direito de ver e fazer cópias dos registros relacionados ao estudo de seu filho conforme permitido pela lei em vigor. Você poderá solicitar tais registros ao investigador. No entanto, para garantir a integridade científica do estudo, você

concorda que você não poderá revisar ou fazer cópias de alguns dos registros de seu bebê relacionados ao estudo até que o estudo tenha sido concluído.

PRÉ-CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Li e compreendi este Termo de Pré-Consentimento Livre e Esclarecido. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas de forma satisfatória. Concordo voluntariamente que meu bebê participe deste estudo de pesquisa. Assinando este termo de consentimento, não abri mão de quaisquer direitos que meu bebê teria direito de outra forma como um paciente em um estudo de pesquisa. Eu autorizo o uso e a divulgação das informações de saúde de meu bebê às partes relacionadas na seção acima com relação às informações a respeito do acesso aos registros médicos de meu bebê para os objetivos descritos acima. Receberei uma cópia assinada e datada deste termo de consentimento para meus registros.

Ao assinar este termo de pré-consentimento livre e esclarecido, confirmo que tenho autoridade legal (custódia legal) para permitir que esta criança participe do estudo.

Fornei cópias dos papéis de tutela que documentam que tenho a autoridade legal descrita acima ao médico do estudo ou pessoa designada (por favor, anexe)

Nome do Paciente em Letras de Forma

Nome do Pai/Mãe ou Tutor Legalmente Autorizado em Letras de Forma

Assinatura do Pai/Mãe ou Tutor Legalmente Autorizado

Data

Nome da Pessoa que Conduziu a Discussão do Consentimento em Letras de Forma

Assinatura da Pessoa que Conduziu a Discussão
do Consentimento em Letras de Forma

Data

12.3 Anexo C – Parecer do Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

| FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS | | | | FR - 255230 | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Projeto de Pesquisa TOLERÂNCIA GASTROINTESTINAL E ABSORÇÃO DE CÁLCIO COMPARATIVA EM LACTENTES SAUDÁVEIS, ALIMENTADOS COM FÓRMULAS À BASE DE LEITE COM DIFERENTES COMBINAÇÕES DE GORDURA | | | | | |
| Área de Conhecimento 4.00 - Ciências da Saúde - 4.01 - Medicina - Preve | | | | Grupo Grupo II | Nível Prevenção |
| Área(s) Temática(s) Específica(s) | | | | | Fase Não se Aplica |
| Unitermos FÓRMULA INFANTIL, CÁLCIO, ÁCIDOS GRAXOS, ABSORÇÃO | | | | | |
| Sujeitos na Pesquisa | | | | | |
| Nº de Sujeitos no Centro 40 | Total (Brasil) 40 | Nº de Sujeitos Total 40 | Grupos Especiais Criança e ou menores de 18 anos | | |
| Placebo NÃO | Medicamentos EV / AIDS NÃO | Wash-out NÃO | Sem Tratamento Específico NÃO | Banco de Materiais Biológicos NÃO | |
| Pesquisador Responsável | | | | | |
| Pesquisador Responsável Hugo da Costa Ribeiro Junior | | CPF 241.484.405-13 | | Identidade 1.250.586 | |
| Área de Especialização Gastroenterologia Pediátrica | | Maior Titulação Dr. Med. Interna | | Nacionalidade Brasileira | |
| Endereço Rua Amazonas, 159/503 Ed. Serra do Nascente | | Bairro Ptuga | | Cidade Salvador - BA | |
| Código Postal 41830-380 | Telefone 3330-8295 / 3351-1808 | Fax 3331-2027 | Email HUGCCRJ@UFBA.BR | | |
| Termo de Compromisso | | | | | |
| Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. | | | | | |
| Data: _____ | | | Assinatura _____ | | |
| Instituição Onde Será Realizado | | | | | |
| Nome Hospital Universitário Prof. Edgard Satrios | | CNPJ 15.180.714/0002-87 | | Nacional/Internacional Nacional | |
| Unidade/Órgão CPPHO | | Participação Estrangeira NÃO | | Projeto Multicêntrico NÃO | |
| Endereço Rua João das Botas s/n | | Bairro Canela | | Cidade Salvador - BA | |
| Código Postal 40110-160 | Telefone (71)237-7353 | Fax (71)245-7110 | Email hupes@ufba.br | | |
| Termo de Compromisso | | | | | |
| Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução. | | | | | |
| Nome: _____ | | Assinatura _____ | | | |
| Data: _____ | | Projeto Autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CONEP | | | |
| Patrocinadora Com-HUPES-UFBA | | | | | |
| Nome Abbott Laboratórios do Brasil Ltda | | CNPJ 58.958.701/0001-16 | | | |
| Endereço Rua Michigan, 735 | | Bairro sn | | Cidade São Paulo - SP | |
| Código Postal 04568905 | Telefone (11) 5536-7423 | Fax (11) 5536-7423 | Email | | |
| Responsável Fabiola B Mestrich | | Cargo / Função Monitora de Pesquisa Clínica | | | |

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 13/04/2009. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
 MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
 UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 IORG0003460, Assurance FWA00002471, October 26, 2010
 IRB00004123, October 5, 2007 - October 4, 2010

Rua Augusto Viana, s/n, Centro – Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 1ª andar
 Cep: 40.110-140 – Salvador-Bahia – telef: (71) 330-4040 – e-mail: pgs@ufba.br – homepage: www.ufba.br

PARECER/RESOLUÇÃO N.º 047/2009

Registro CEP. 042/09 (Este n.º deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Título do Projeto. “Protocolo AK76 — Tolerância Gastrointestinal e Absorção de Cálcio Comparativa em Lactantes a Termo Saudáveis, Alimentados com Fórmulas à Base de Leite com Diferentes Combinações de Gordura”, versão 1, datada de 05 de Março de 2009. “Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido” datado de 06 de Abril de 2009.

Patrocínio/Financiamento. Abbott Laboratórios do Brasil Ltda. Orçamento detalhado, suficiente.

Pesquisador Responsável. Professor, Doutor, Hugo da Costa Ribeiro Júnior. Professora, Doutora, Ângela Peixoto de Mattos e Mestre Teresa Cristina Medrado Ribeiro, componentes do “staff”. “Curricula Vitae” apensos.

Instituição. Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, este integrado também pelo Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira e pelo Pavilhão Professor José Francisco Magalhães Neto, Universidade Federal da Bahia. C-UIUPES/CPHO/PPJFMN/UFBA.

Área do Conhecimento. 4.00, Ciências da Saúde; 4.05, Nutrição; Nível D; Grupo III.

Objetivo Geral — avaliar a tolerância gastrointestinal e a absorção de cálcio, comparativamente em lactantes a termo normal, saudáveis, utilizando-se as duas fórmulas de leite propostas, com e sem “oleína de palma” como gordura principal. Variável Principal e Secundárias, de Base e de Segurança, serão consideradas.

Resumo. Trata-se de estudo randomizado, cego, de absorção e tolerância, cruzado. Serão selecionados 40 (quarenta) lactantes saudáveis em creches de Salvador. **Critérios de Inclusão, de Exclusão, Análise Estatística, Cronograma, Orçamento, Questionários e “Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido” (TCLPE)** anexos.

Comentários. O Projeto está bem formulado, com Resumo e Fundamentação Teórica bem explicitados. O TCLPE, porém, redigido em 12 (doze) páginas, com grande quantidade de informações que podem vir a confundir os pais ou responsáveis.





COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
 MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
 UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 IORG0003460. Assurance FWA00002471, October 26, 2010
 IRB00004123, October 5, 2007 - October 4, 2010

Rua Augusto Viana, s/n, Centro - Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 17 andar
 Cep: 40.110-100 - Salvador-Bahia - tel/fax: (71) 320-8010 e-mail: cep@ufba.br - www.cep@ufba.br

Recomenda-se então, atenção redobrada ao Pesquisador Responsável para que o conteúdo do mesmo seja bem explicitado e fornecido, se necessário, em mais de uma etapa. **Protocolo aprovável.**

Aprovado.

Salvador, 27 de Maio de 2009



 Professor, Doutor, Antônio dos Santos Barata
 Coordenador – CEP/MCO/UFBA

Observação importante: toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (à) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução e nas "Recomendações Adicionais" apenas, **bem como a imposterável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação**, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).



12.4 Anexo D – Registro Clinical Trial

08/08/2016 Comparative Ca Absorption and Tolerance in Healthy Term Infants Fed Milk-based Formulas With Different Fat Blends - Full Text View - ClinicalT...



A service of the U.S. National Institutes of Health

Comparative Ca Absorption and Tolerance in Healthy Term Infants Fed Milk-based Formulas With Different Fat Blends

This study has been completed.

Sponsor:
Abbott Nutrition

Information provided by:
Abbott Nutrition

ClinicalTrials.gov Identifier:
NCT00941564

First received: July 14, 2009
Last updated: November 24, 2010
Last verified: November 2010
[History of Changes](#)

[Full Text View](#)
[Tabular View](#)
[No Study Results Posted](#)
[Disclaimer](#)
[How to Read a Study Record](#)

Purpose

The objective is to assess the comparative calcium absorption and gastrointestinal (GI) tolerance in healthy normal term infants fed two commercially available powdered milk-based formulas which contain different fat blends.

| Condition | Intervention | Phase |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Infant | Other: Infant Formula milk based Other: Infant formula milk based | Phase 4 |

Study Type: Interventional
Study Design: Allocation: Randomized
Endpoint Classification: Efficacy Study
Intervention Model: Crossover Assignment
Masking: Double Blind (Subject, Investigator, Outcomes Assessor)
Primary Purpose: Treatment

Official Title: "Comparative Calcium Absorption and Gastrointestinal Tolerance in Healthy Term Infants Fed Milk-based Formulas With Different Fat Blends"

Resource links provided by NLM:

MedlinePlus related topics: [Calcium](#) [Infant and Newborn Nutrition](#)

[U.S. FDA Resources](#)

Further study details as provided by Abbott Nutrition:

Primary Outcome Measures:

- Calcium absorption [Time Frame: 18 days] [Designated as safety issue: No]

Secondary Outcome Measures:

- Calcium retention, fat absorption, tolerance [Time Frame: 18 days] [Designated as safety issue: No]

Enrollment: 33
Study Start Date: March 2010
Study Completion Date: May 2010
Primary Completion Date: May 2010 (Final data collection date for primary outcome measure)

| Arms | Assigned Interventions |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Experimental: Commercially available infant formula A Varying fat blend from comparator product | Other: Infant Formula milk based Consume ad lib |
| Active Comparator: Commercially available infant formula B | Other: Infant formula milk based consume ad lib |

▶ Eligibility

Ages Eligible for Study: 84 Days to 159 Days (Child)
 Genders Eligible for Study: Both
 Accepts Healthy Volunteers: Yes

Criteria

Inclusion Criteria:

- Infant in good health, full term, singleton birth and 84-156 days of age at enrollment. Male infants only to be enrolled for primary variable measures.
- Restrict use of certain medications or home remedies, herbal preparations, probiotics or rehydration/intravenous (IV) fluids.

Exclusion Criteria:

- Adverse maternal, fetal or infant medical history that is thought by the investigator to have potential for effects on tolerance, growth, and/or development.
- Infant has been treated with antibiotics 3 days prior to enrollment.
- Infant has received probiotics-containing products 3 days prior to enrollment.

▶ Contacts and Locations

Choosing to participate in a study is an important personal decision. Talk with your doctor and family members or friends about deciding to join a study. To learn more about this study, you or your doctor may contact the study research staff using the Contacts provided below. For general information, see [Learn About Clinical Studies](#).

Please refer to this study by its ClinicalTrials.gov identifier: NCT00941564

Locations

Brazil

Department of Pediatrics, Federal University of Bahia
 Salvador, Bahia, Brazil

Sponsors and Collaborators

Abbott Nutrition

Investigators

Study Director: John Lasekan, PhD Abbott Nutrition

▶ More Information

Publications automatically indexed to this study by ClinicalTrials.gov Identifier (NCT Number):

[Leite ME, Lasekan J, Baggs G, Ribeiro T, Menezes-Filho J, Pontes M, Druzian J, Barreto DL, de Souza CO, Mattos A, Costa-Ribeiro H Jr. Calcium and fat metabolic balance, and gastrointestinal tolerance in term infants fed milk-based formulas with and without palm olein and palm kernel oils: a randomized blinded crossover study. BMC Pediatr. 2013 Dec 24;13:215. doi: 10.1186/1471-2431-13-215.](#)

Responsible Party: Bobbie Swearengin, Abbott Nutrition
 ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00941564 History of Changes
 Other Study ID Numbers: AK76
 Study First Received: July 14, 2009
 Last Updated: November 24, 2010
 Health Authority: Brazil: Ethics Committee

ClinicalTrials.gov processed this record on August 07, 2016

12.5 Anexo E – Planilhas do Excel para Cálculos

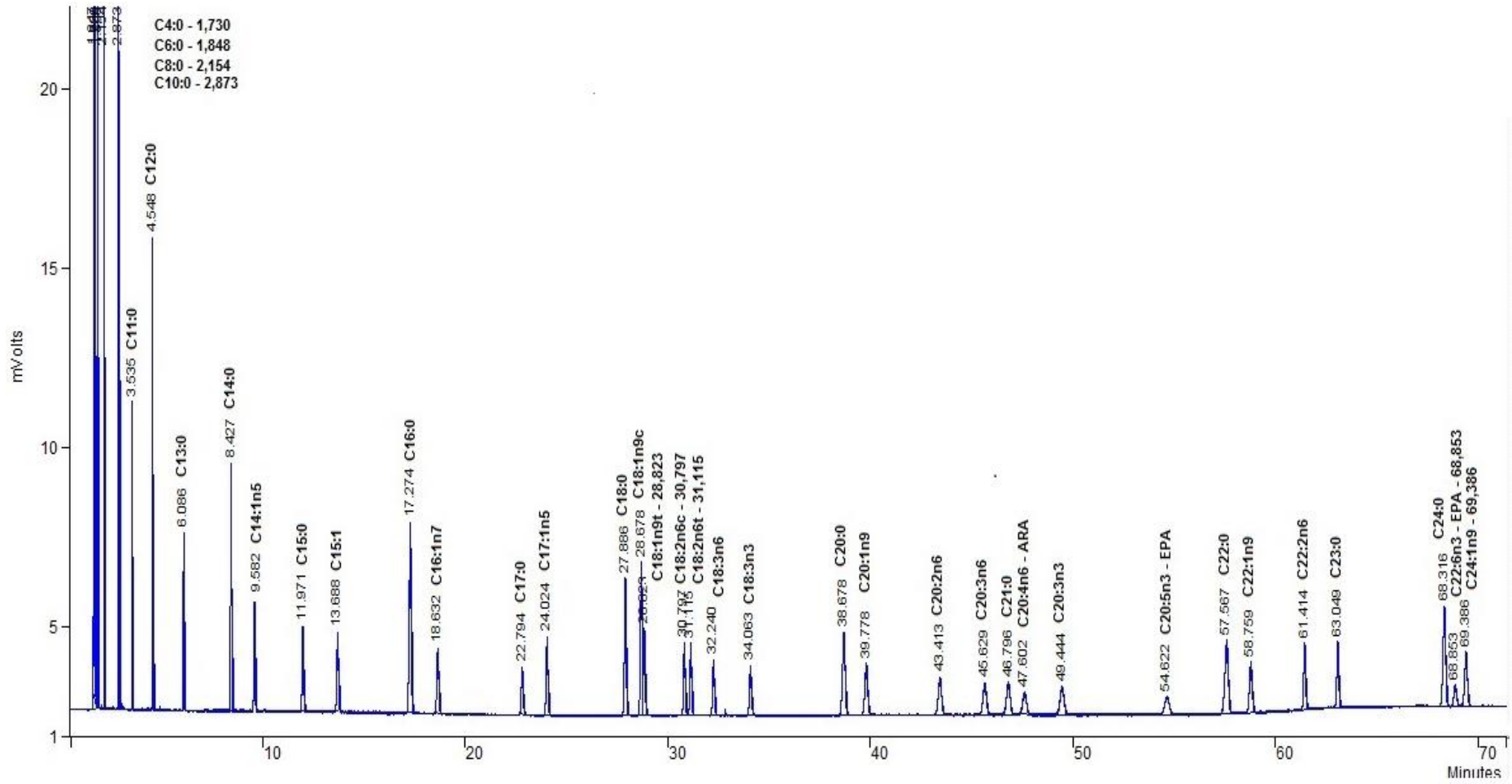
| Peso (Kg) | | | | |
|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 |
| Peso (Kg) | 8,31 | 8,32 | 8,29 | 8,34 |
| Média Peso | 8,32 | | | |
| Ingestão da Fórmula (g) | | | | |
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 |
| Número de Ingestões | Ingestão (g) | Ingestão (g) | Ingestão (g) | Ingestão (g) |
| 1 | 36 | 136 | 137 | |
| 2 | 132 | 110 | 117 | |
| 3 | 73 | 94 | 137 | |
| 4 | 88 | 96 | 133 | |
| 5 | 120 | 88 | 138 | |
| 6 | 64 | 62 | 55 | |
| 7 | 46 | 113 | 91 | |
| 8 | 81 | 43 | 108 | |
| 9 | | | 58 | |
| 10 | | | | |
| Total de Fórmula Ingerida dia (g) | 640 | 742 | 974 | 0 |
| Fórmula Ingerida (g/Kg/d) | 94,45 | | | |

| Gordura Total | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| % de gordura na fórmula | | | | | | | | |
| 3,93 | | | | | | | | |
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 | | | | |
| Gordura ingerida por dia (g) | 25,15 | 29,16 | 38,28 | 0,00 | | | | |
| Total de Gordura Ingerida (g/Kg/d) | 3,71 | | | | | | | |
| | Dia 1 | | Dia 2 | | Dia 3 | | Dia 4 | |
| | Peso das fezes (g) | % gordura fezes | Peso das fezes (g) | % gordura fezes | Peso das fezes (g) | % gordura fezes | Peso das fezes (g) | % gordura fezes |
| Amostra de Fezes | | | 19,00 | 5,58 | 7,00 | 6,23 | 15,00 | 5,53 |
| Gordura Excretada por dia (g) | 0,00 | | 1,06 | | 0,44 | | 0,83 | |
| Total de Gordura Excretada (g/Kg/d) | 0,09 | | | | | | | |
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 | | | | |
| Gordura Absorvida por dia (g) | 25,15 | 28,10 | 37,84 | -0,83 | | | | |
| Gordura Absorvida (g/Kg/d) | 3,62 | | | | | | | |
| % de Gordura Absorvida (g/kg/d) | 97,49 | | | | | | | |

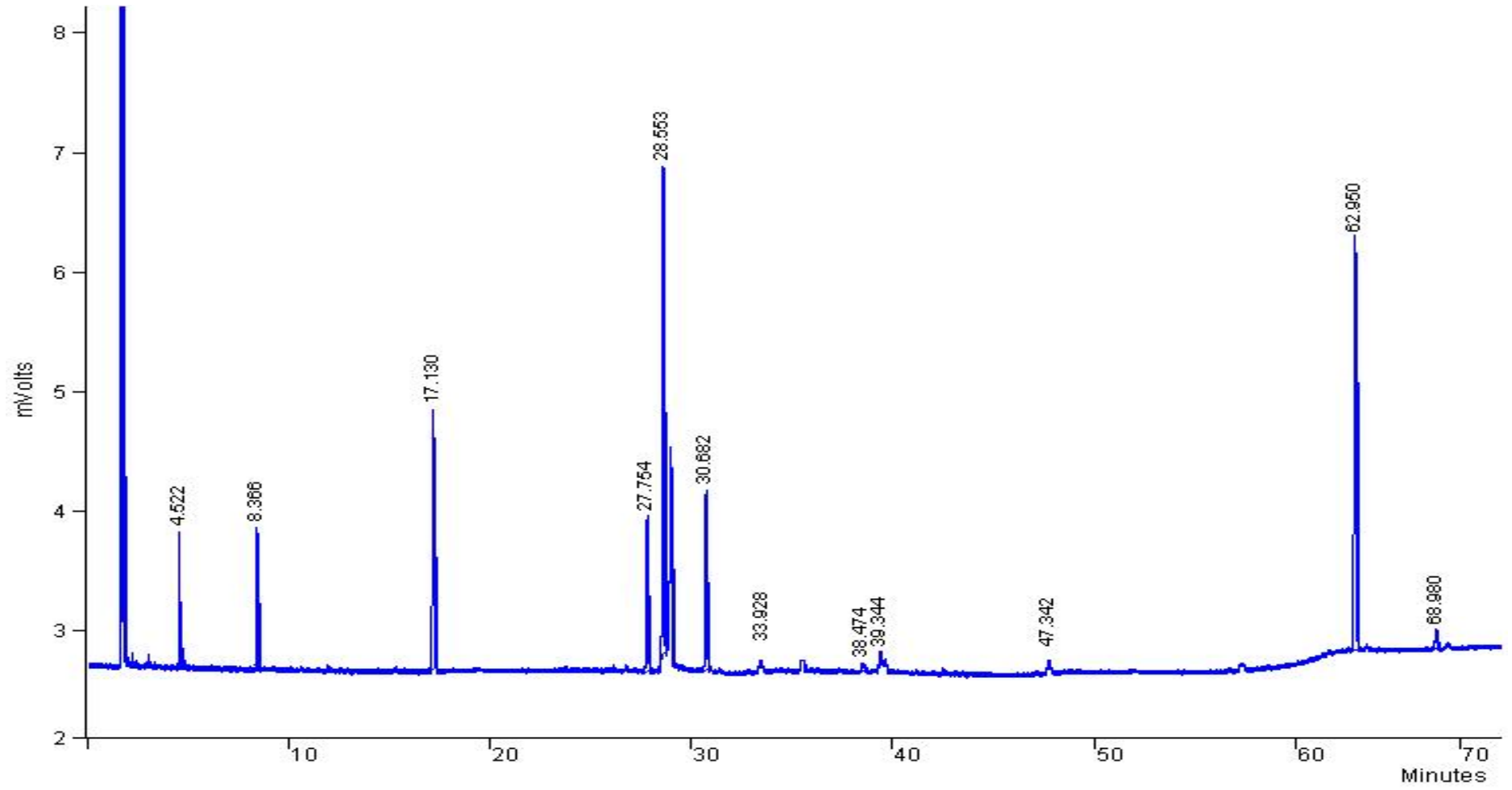
| C16:0 | | | | |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| mg de AG na fórmula | | | | |
| 35,23 | | | | |
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 |
| C16:0 Ingerido por dia (mg) | 886,10 | 1027,33 | 1348,54 | 0,00 |
| C16:0 Ingerido (mg/Kg/d) | 130,77 | | | |
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 |
| Amostra de Fezes | C16:0 (mg) fezes | C16:0 (mg) fezes | C16:0 (mg) fezes | C16:0 (mg) fezes |
| C16:0 excretado por dia (mg) | 0,00 | 33,81 | 56,00 | 69,65 |
| C16:0 excretado (mg/Kg/d) | 4,73 | | | |
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 |
| C16:0 Absorvido por dia (mg) | 886,10 | 991,48 | 1324,12 | -57,77 |
| C16:0 Absorvido (mg/Kg/d) | 126,03 | | | |
| % de C16:0 Absorvido (mg/kg) | 96,38 | | | |
| C18:0 | | | | |
| mg de AG na fórmula | | | | |
| 14,66 | | | | |
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 |
| C18:0 Ingerido por dia (mg) | 368,73 | 427,49 | 561,16 | 0,00 |
| C18:0 Ingerido (mg/Kg/d) | 54,41 | | | |
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 |
| Amostra de Fezes | C18:0 (mg) fezes | C18:0 (mg) fezes | C18:0 (mg) fezes | C18:0 (mg) fezes |
| C18:0 excretado por dia (mg) | 0,00 | 17,93 | 30,59 | 36,50 |
| C18:0 excretado (mg/Kg/d) | 2,51 | | | |
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 |
| C18:0 Absorvido por dia (mg) | 368,73 | 408,49 | 547,82 | -30,28 |
| C18:0 Absorvido (mg/Kg/d) | 51,90 | | | |
| % de C18:0 Absorvido (mg/kg) | 95,39 | | | |

12.6 Anexo F - Cromatogramas Amostras e Padrão

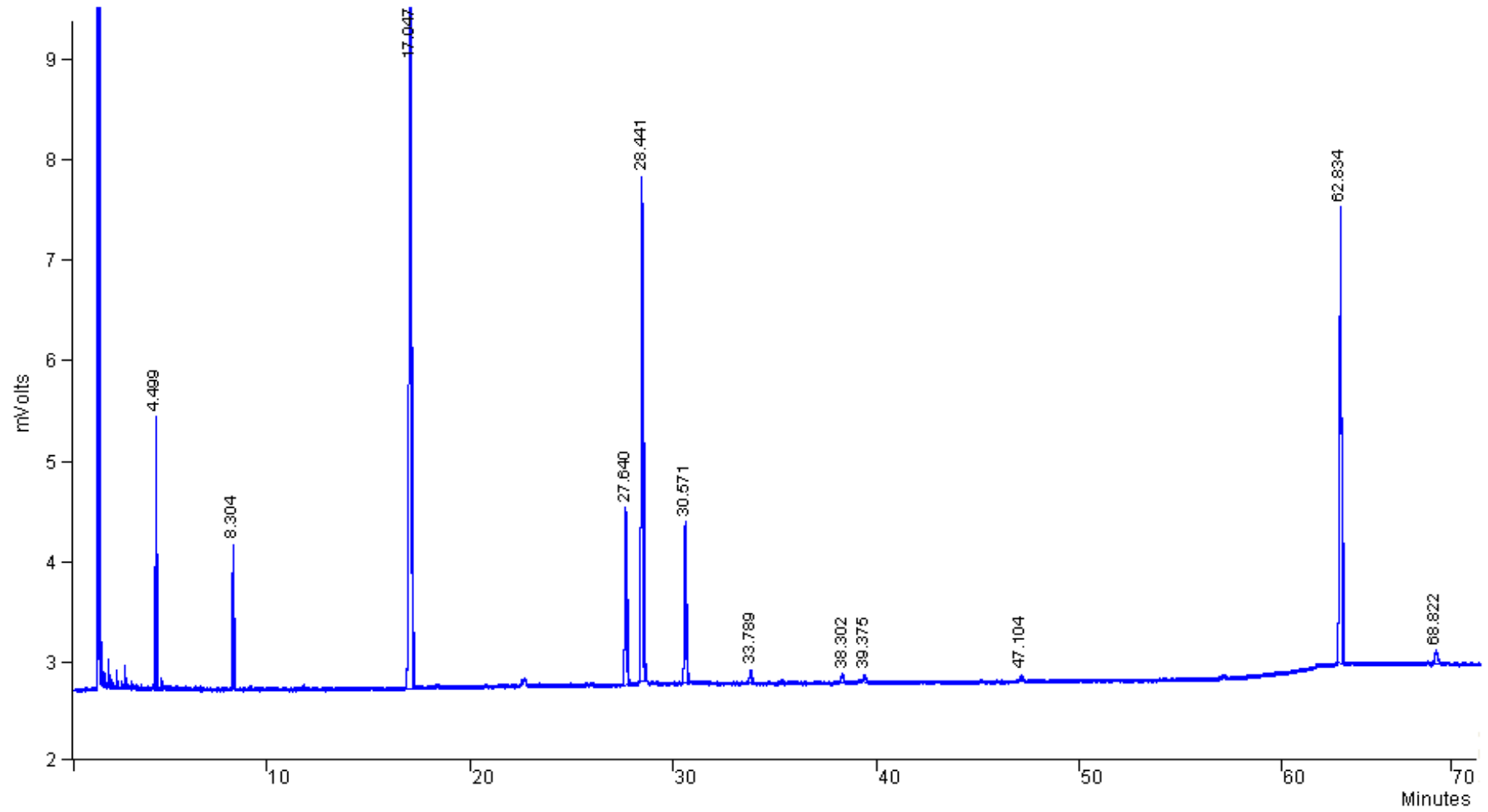
Cromatograma Padrão de Ácidos Graxos



Amostra ARC 1ª Fase



Amostra ARC 2ª fase



12.7 Anexo G – Produção científica durante o doutorado 2012-2016

Artigos relacionados à tese de doutorado publicados em revistas científicas

1. **Carolina Oliveira de Souza**, Maria Efigênia Q. Leite, John Lasekan, Lorena Silva Pinho, Janice Izabel Druzian, Tereza Cristina M. Ribeiro, Ângela P. Mattos, José A. Menezes-Filho, Hugo Costa-Ribeiro. Comparative effects of formula milk containing different vegetable oils on fatty acid metabolic balance in term infants: a randomized, blinded, crossover clinical trial. *Lipids in Health and Disease*.

2. Maria Efigênia de Queiroz Leite, John Lasekan, **Carolina Oliveira de Souza**, Geraldine Baggs, Tereza Ribeiro, Mariana Pontes, Giane Fratias, Danile Barreto, Ângela Mattos, Hugo Costa-Ribeiro. Calcium and fat balance, and gastrointestinal tolerance in term infants fed milk-based formulas with and without palm olein and palm kernel oils: a randomized blinded crossover study. *BMC Pediatrics*, 13(1), 1-9, 2013.

3. **Carolina Oliveira de Souza**, Katya Karine Perazzo, Janice Izabel Druzian, Hugo da Costa Ribeiro Júnior. Prospecção tecnológica sobre a suplementação nutricional de fórmulas infantis com ácidos graxos. *Simtec*, 1, 211-222, 2013.

Outros artigos publicados em revistas científicas (co-autora)

1. Saraiva, L. E. F., Naponucena, L. M., Santos, V., Silva, R. D., **Souza, C. O.**, Souza, I. L., Druzian, J. I. (2016). Development and application of edible film of active potato starch to extend mini panettone shelf life. *LWT-Food Science and Technology*.

2. Hussain, J., Liu, Y., Lopes, W. A., Druzian, J. I., **Souza, C. O.**, Carvalho, G. C., Liao, W. (2015). Effects of different biomass drying and lipid extraction methods on algal lipid yield,

fatty acid profile, and biodiesel quality. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6), 3048-3057.

3. Cabanelas, I. T. D., Marques, S.I., **Souza, C. O.**, Druzian, J. I., Nascimento, I. A. (2015). Botryococcus, what to do with it? Effect of nutrient concentration on biorefinery potential. *Algal Research*, 11, 43-49.

4. Reis, L. C. B., **Souza, C. O.**, da Silva, J. B. A., Martins, A. C., Nunes, I. L., Druzian, J. I. (2015). Active biocomposites of cassava starch: the effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 382-391.

5. Costa, S. S., Druzian, J. I., Machado, B. A. S., **Souza, C. O.**, Guimarães, A. G. (2014). Bi-Functional biobased packing of the cassava starch, glycerol, licuri nanocellulose and red propolis. *PloS One*, 9(11), e112554.

6. Perazzo, K. K. L., Conceição, A. C., Santos, J. P., de Jesus Assis, D., **Souza, C. O.**, Druzian, J. I. (2014). Properties and antioxidant action of actives cassava starch films incorporated with green tea and palm oil extracts. *PloS One*, 9(9), e105199.

7. Nascimento, I.A., Marques, S.I., Cabanelas, I.D., de Carvalho, G. C., Nascimento, M. A., **Souza, C. O.**, Liao, W. (2014). Microalgae versus land crops as feedstock for biodiesel: productivity, quality, and standard compliance. *Bioenergy Research*, 7(3), 1002-1013.

8. Nascimento, I. A., Marques, S.I., Cabanelas, I.D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., **Souza, C. O.**, Nascimento, M. A. (2013). Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenergy Research*, 6(1), 1-13.

9. Cabanelas, I. T., Arbib, Z., Chinalia, F. A., **Souza, C. O.**, Perales, J. A., Almeida, P. F., Nascimento, I. A. (2013). From waste to energy: microalgae production in wastewater and glycerol. *Applied Energy*, 109, 283-290.

10. **Souza, C. O.**, Silva, L. T., Druzian, J. I. (2012). Estudo comparativo da caracterização de filmes biodegradáveis de amido de mandioca contendo polpas de manga e de acerola. *Química Nova*, 35(2), 262-267.

11. **Souza, C. O.**, Souza Menezes, J. D., Neto, D. C. R., de Aquino Assis, J. G., da Silva, S. R., & Druzian, J. I. (2012). Carotenoides totais e vitamina A de cucurbitáceas do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. *Ciência Rural*, 42(5), 926-933.

Capítulos de livros publicados

1. **Souza, C.O.**, Veiga-Santos, P., Druzian, J.I. Natural Ingredients as Additive for Active Antioxidant Food Packaging. In: Lima, Giuseppina P.P. and Vianello, Fabio. (Org.). *Food Quality, Safety and Technology*. 1ed. New York: Springer, 2013, p. 179-188.

2. Druzian, J.I. **Souza, C.O.**, Pascoal, D.R.C., Nunes, I.L. Farinha de copioba e seu potencial para Indicação Geográfica (IG). In: Raul Lody. (Org.). *Farinha de mandioca o sabor brasileiro e as receitas da Bahia*. 1ed.São Paulo: Senac São Paulo, 2013, p. 131-161.

Patentes

1. Moura, L.E., **Souza, C.O.**, Veiga-Santos, Pricila, Druzian, J.I. Processo e composição de material polimérico sintético e aditivos naturais, com eficácia antioxidante e antimicrobiana, por extrusão. 2013, Brasil. BR1020130339156.

Prêmios

1. Prêmio Inventor UFBA, Categoria Inventor Nacional, Universidade Federal da Bahia, 2014.

2. Bimbo Pan-American Nutrition - Food Science and Technology Awards, Grupo Bimbo, 2013.

3. Honra ao Mérito, Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2013.