



Licenciatura em Ciências da Nutrição

**Avaliação da Actividade Antioxidante de Leite Materno, Fórmulas
Infantis e Leites Comerciais**

Elaborado por Mariana Gouveia Correia Tavares

Aluno nº 200791704

Orientador: Prof. Doutor Paulo Figueiredo

Barcarena

Novembro 2011

Universidade Atlântica

Licenciatura em Ciências da Nutrição

**Avaliação da Actividade Antioxidante de Leite Materno, Fórmulas
Infantis e Leites Comerciais**

Elaborado por Mariana Gouveia Correia Tavares

Aluno nº 200791704

Orientador: Prof. Doutor Paulo Figueiredo

Barcarena

Novembro 2011

O autor é o único responsável pelas ideias expressas neste relatório

Resumo

Objectivo: A determinação da actividade antioxidante do leite materno permite uma caracterização global do seu valor, possibilitando a minimização do *stress* oxidativo dos recém-nascidos. Assim surge o interesse em determinar a os compostos fenólicos totais e a actividade antiradicalar e redutora de leite materno, de fórmulas infantis e de leites comerciais para lactentes.

Metodologia: foi feita uma análise química de leite materno, fórmulas infantis e leites comerciais. Utilizaram-se os ensaios de DPPH^{*}, o FRAP e o Folin-Ciocalteau para a determinação da actividade antioxidante.

Resultados: o leite materno apresentou uma menor actividade antioxidante que os leites comerciais em todos os ensaios. O leite materno apresentou uma melhor actividade redutora férrica e uma menor actividade antiradicalar que as fórmulas infantis. A nível de compostos fenólicos totais os leites comerciais apresentaram uma maior quantidade seguida das fórmulas e por fim o leite materno.

Conclusão: de acordo com os resultados verifica-se a existência de diferenças na capacidade antioxidante entre o leite materno e os leites comerciais. Estes, devido à sua suplementação com vitaminas e outros componentes apresentam uma maior actividade antioxidante que o leite materno e as fórmulas infantis.

Abstract

Objective: the determination antioxidant activity of breast milk allows a global characterization of its value, enabling minimization of infant oxidative stress. Thus arises the interest in determining the total phenolic content, the ferric reducing antioxidant activity and the scavenging activity of breast milk, infant formulas and commercial milk.

Methodology: a chemical analysis was performed of breast milk, infant formula and commercial milk. DPPH, FRAP and Folin-Ciocalteau were used for antioxidant activity determination.

Results: breast milk had a lower antioxidant activity than commercial milks in all methods. Breast milk showed better reduction ferric activity and less scavenging activity than infant formulas. The amount of total phenolic content was major in commercial milks than infant formula than breast milk.

Conclusion: according to the results there are differences in the antioxidant capacity of breast milk and commercial milk. This one, because of its supplementation with vitamins and other components has a greater antioxidant activity than breast milk and infant formula.

Índice

Resumo	Erro! Marcador não definido.
Abstract	Erro! Marcador não definido.
Índice	iii
Índice de Figuras	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
Introdução	1
1. Objectivos	4
2. Metodologia	4
2.1. Amostragem	4
2.2. Técnicas Utilizadas	5
2.3. Análise de dados	7
3. Resultados	7
3.1. Determinação da actividade antiradicalar com DPPH'	7
3.2. Actividade redutora do leite com FRAP	9
3.3. Compostos fenólicos totais pelo ensaio de Folin-Ciocalteau	10
4. Discussão	10
Conclusão	14
Bibliografia	15

Índice de Figuras

Fig. 1 – Valores da inibição de DPPH' em equivalentes de ácido gálico para os leites analisados.....	8
Fig. 2 – Valores da actividade redutora em equivalentes de FeSO ₄ para os leites avaliados.....	9
Fig. 3 – Valores de compostos fenólicos totais em equivalentes de ácido gálico para os leites estudados.....	10

Lista de abreviaturas e siglas

AA – Actividade antioxidante

CAT – Capacidade antioxidante total

CFT – Compostos fenólicos totais

DPPH – 2,2-Difenilo-1-picril-hidrazilo

F – Fórmula Infantil

FCT – Faculdade de Ciências e Tecnologia

FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power

LC – Leites de Crescimento

LM – Leite Materno

LV- Leite de vaca

MeOH – Metanol

ERO – Espécies reactivas de oxigénio

RPM – Rotações por minuto

UNL – Universidade Nova de Lisboa

Introdução

O leite materno é o melhor alimento para um recém-nascido pois fornece todos os nutrientes necessários para um crescimento e desenvolvimento adequados durante os primeiros 6 meses de vida (Levy, Bértolo, 2008).

A composição do leite materno é complexa, varia de mãe para mãe e é afectada pela fase de amamentação, a idade do lactente, o período do dia e a alimentação da mãe (Brown, Isaacs, 2007; Samour, King, 2010).

O leite materno fornece 650 a 700 kcal por litro e contém hidratos de carbono (o maior grupo de nutrientes presente no leite), lípidos (o segundo maior grupo de nutrientes presente no leite) e por fim proteínas. O leite também tem na sua composição várias vitaminas, tais como o Retinol, Vitamina D, E, C assim como carotenóides, entre outras e contém minerais tais como cálcio, fósforo, magnésio, ferro, zinco, potássio entre outros (Samour, King, 2010).

Com o avanço da ciência e o aparecimento de novas tecnologias, tem existido a possibilidade de fabricar novos produtos, como as fórmulas infantis. Estas são uma alternativa ao leite materno e cada vez mais complexas, sendo desenvolvidas a partir do leite de outros mamíferos e de outras fontes (Ávila, 2004).

O leite materno apresenta uma actividade antioxidante que se deve à presença de inúmeros componentes bioactivos, com capacidades variadas de neutralizar radicais livres ou espécies oxidantes. Estas propriedades previnem a ocorrência de reacções de oxidação lipídica e permitem eliminar espécies reactivas de oxigénio (ERO) (Shoji et al., 2004).

Segundo Shoji *et al.*, 2004, o dano oxidativo do ADN é consideravelmente mais suprimido em bebés amamentados do que naqueles alimentados com fórmulas infantis, ou seja, o leite materno pode suprimir o *stress* oxidativo e o dano oxidativo do ADN de bebés com 14 dias de vida (Shoji et al., 2004).

Kasapović *et al.*, 2005, determinaram a actividade de enzimas antioxidantes existentes no leite materno. Estas enzimas, que incluem a catalase, a dismutase do superóxido, a peroxidase da glutathione, constituem a base da nossa defesa enzimática endógena contra o “stress” oxidativo, e encontram-se também no plasma onde desempenham um importante papel no combate às ERO e à peroxidação lipídica (Kasapović *et al.*, 2005).

Segundo Tijerina-Sáenz, Innis, Kitts, 2009, os principais antioxidantes exógenos existentes no leite materno são as vitaminas E e C, o retinol e o β -caroteno. Estes antioxidantes ou provêm da dieta ou são sintetizados a partir de compostos contidos nos alimentos. O estudo realizado por estes autores teve como objectivo avaliar a capacidade antioxidante do leite materno e encontrar uma correlação com os seus componentes. Verificaram que a capacidade antioxidante do leite foi atribuída à presença de α -tocoferol e que a vitamina E é um importante contribuinte para a estabilidade oxidativa do leite (Tijerina-Sáenz, Innis, Kitts, 2009).

Alguns antioxidantes podem ser encontrados em maior concentração nas fórmulas e leites comerciais do que no leite materno; esta diferença pode dever-se às diferenças de alimentação das duas espécies produtoras (humanos e vacas) e/ou à suplementação das fórmulas e leites comerciais. É o caso de compostos fenólicos como o ácido hidroxibenzóico que poderá ser mais abundante nas rações animais, nomeadamente na erva. Em contrapartida, a alimentação humana pode incluir uma abundância de frutos ricos em ácido ascórbico ou de gorduras polinsaturadas como as existentes no peixe gordo ou nas nozes, o que vai conferir ao leite materno uma variedade de espécies antioxidantes dificilmente encontradas em leite de vaca (Li *et al.*, 2009).

A composição do leite materno é afectada por vários factores, nomeadamente pela dieta da lactante e pela idade do lactente. Segundo Lonnerdal, 1986, é difícil avaliar o efeito da dieta materna na composição do leite. A desidratação, factor associado à malnutrição pode afectar significativamente os fluxos de água no corpo e consequentemente pode afectar o volume de leite produzido. No entanto, o organismo materno mesmo em situações de malnutrição mantém um nível de nutrientes no leite, em particular proteína que permite a alimentação do lactente, ainda que com sacrifício das reservas da mãe (Lonnerdal, 1986).

O efeito da idade do lactente na composição do leite materno pode observar-se de forma ainda mais evidente quando se comparam prematuros com bebés de termo. L'Abbe e Friel, 2000, compararam a actividade antioxidante do leite de mães com gravidez de termo e do leite de mães de prematuros e verificaram que o leite de mães com gravidez prematura tinha uma quantidade superior de enzimas antioxidantes (peroxidase da glutathione e dismutase do superóxido) em comparação com o leite de mães com gravidez de termo. No entanto, se a quantidade total de leite produzida pelas mães de prematuros for inferior à quantidade de leite produzida pelas mães de bebés de termo, a quantidade de nutrientes e de componentes antioxidantes fornecidos ao lactente poderão ser inferiores (L'Abbe e Friel, 2000).

O estado fisiológico da mãe é condicionado por diversos factores nomeadamente pela sua idade o que vai influenciar as características do leite materno. Azeredo e Trugo, 2008, determinaram a concentração de vários antioxidantes, nomeadamente do retinol, carotenoides e tocoferol em mães adolescentes e verificaram que no leite maduro de lactantes adultas, a concentração destes antioxidantes era superior à existente em lactantes adolescentes. Este tipo de resultados confirma a noção médica de que as mães adolescentes, estando ainda num processo de desenvolvimento físico têm necessidade de uma maior mobilização dos nutrientes e dos componentes essenciais da dieta para o desenvolvimento do seu próprio organismo pelo que a gravidez representa uma pressão nutricional para a mãe. Esta situação traduz-se num gasto excessivo dos nutrientes essenciais, pelo que a dieta das mães adolescentes deve ser particularmente rica em nutrientes e componentes como antioxidantes, vitaminas e sais minerais, de forma a permitir uma abundância suficiente para o bom desenvolvimento do organismo da mãe, do organismo do bebé e ainda permitir que após o parto o organismo materno se encontre suficientemente nutrido para poder produzir um leite de boa qualidade (Azeredo, Trugo, 2008).

O leite materno não tem uma composição estática, é um fluido que durante os seis primeiros meses de vida se vai modificando de forma a suprir adequadamente as necessidades do bebé. Zarban *et al.*, 2009, avaliaram as alterações no leite materno durante os 6 primeiros meses pós-parto, em relação à capacidade antioxidante total

(CAT) e em relação à actividade sequestradora de radicais livres. Estes autores concluíram que a CAT era mais elevada no colostro do que no leite transicional e maduro assim como para o outro parâmetro estudado (Zarban *et al.*, 2009).

1. Objectivos

A determinação da actividade antioxidante do leite materno permite uma caracterização global do seu valor, não só enquanto nutriente mas também enquanto alimento funcional, pois possibilita a minimização do *stress* oxidativo dos recém-nascidos. O objectivo deste estudo consistiu em determinar os compostos fenólicos totais e a actividade antiradicalar e redutora de leite materno, de fórmulas infantis e de leites de crescimento para lactentes.

2. Metodologia

2.1. Amostragem

A amostragem deste estudo incluiu leite de lactantes da creche da FCT/UNL e de dadoras voluntárias que se disponibilizaram para participar neste estudo. Os leites de crescimento assim como as fórmulas infantis foram adquiridos em supermercados.

Seleccionaram-se dadoras saudáveis, em diversas fases de lactação, tendo o seu leite sido recolhido em casa, em contentores esterilizados, e congelado de imediato a 6 °C.

O transporte das amostras para o laboratório foi feito num contentor térmico com placas de gelo e foi armazenado a uma temperatura de -20 °C até à análise.

Os leites comerciais, após abertura das embalagens, foram distribuídos por tubos e armazenados a -20 °C até à sua análise.

Todas as amostras de leite foram codificadas de L1 a L16 para os leites maternos, de F1 a F3 para fórmulas infantis para bebés com menos de um ano de idade e de LC1 a LC3 para leites de crescimento para crianças com 1 ano de idade. As amostras codificadas com LC4 e LC5 são leites de crescimento para crianças de 1 a 3 anos de idade e leite para maiores de 3 anos, respectivamente. Os leites codificados com LV1 e LV2 são leites de vaca de chocolate e com aroma de morango, respectivamente.

2.2. Técnicas Utilizadas

As técnicas utilizadas para avaliar a actividade antioxidante dos diferentes tipos de leite foram o Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), e o 2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil (DPPH[•]). Para determinar os compostos fenólicos totais utilizou-se o teste de Folin-Ciocalteu.

As amostras de leite apenas foram analisadas em termos de actividade química e não a nível de actividade enzimática.

2.2.1. Determinação da actividade antiradicalar com DPPH[•]

A actividade antiradicalar do leite foi avaliada através da capacidade de sequestração do radical DPPH[•], seguida por espectroscopia de absorção electrónica (colorímetro de UV-VIS, Pharmacia). O radical DPPH[•] tem um máximo de absorvância a 517 nm, sendo reduzido na presença de antioxidantes, a uma forma incolor; quanto maior for a concentração e a capacidade antiradicalar de um dado antioxidante maior será a diminuição na absorvância a 517 nm.

O protocolo utilizado foi adaptado de Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995. A solução de DPPH[•] foi preparada com 10 mg de DPPH[•] para 250 mL de metanol (MeOH). Depois retiraram-se 4 mL da solução de DPPH[•] preparada para um tubo de centrífuga, juntamente com 0,3 mL de amostra. Incubou-se durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. De seguida centrifugou-se durante 5 minutos a 5000 (rpm) e por fim procedeu-se à leitura das absorvâncias a 517 nm. O ácido gálico foi

usado como padrão e os resultados da inibição do radical DPPH[•] estão expressos em equivalentes de ácido gálico.

2.2.2. Actividade redutora do leite com FRAP

Esta técnica consiste na medição do poder antioxidante, através da avaliação da capacidade de reduzir iões férricos (Fe^{3+}) a iões ferrosos (Fe^{2+}). Os iões ferrosos (Fe^{2+}) formam, com um dos reagentes utilizados, um complexo de cor azul que apresenta um máximo de absorvância a 593 nm.

O protocolo utilizado e adaptado foi proposto por Benzie e Strain, 1999, em que a preparação do reagente FRAP foi feita com 200 mL de tampão acetato adicionando 20 mL de TPTZ e 20 mL de FeCl_3 . Retiraram-se 400 μL de amostra e adicionaram-se 4 mL de reagente FRAP. De seguida incubou-se em banho-maria a 37 °C durante 10 min. Posteriormente adicionaram-se 0,5 mL de clorofórmio e homogeneizou-se bem no vórtex. Centrifugou-se durante 2 minutos a 5000 rpm e procedeu-se à leitura das absorvâncias a 593 nm. O Sulfato de Ferro foi usado como padrão e os resultados estão expressos em equivalentes de sulfato de ferro.

2.2.3. Compostos fenólicos totais pelo teste de Folin-Ciocalteu.

O teste de Folin-Ciocalteu mede os compostos fenólicos totais (CFT) com base numa redução química do reagente (uma mistura de tungsténio e molibdénio) pelos compostos da amostra (Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos, 1999).

O protocolo utilizado e adaptado foi proposto por Li *et al.* 2009. Diluiu-se 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu em 100 mL de água Milli-Q e preparou-se uma solução de 6 g de Carbonato de Sódio em 100 mL de água Milli-Q. Retiraram-se 200 μL de amostra à qual se adicionaram 1,9 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL da solução de Carbonato de Sódio. Incubou-se durante 120 min no escuro e à temperatura ambiente. Posteriormente adicionaram-se 0,5 mL de clorofórmio. A mistura foi

centrifugada durante 2 minutos a 5000 rpm e depois lida a absorvância a 725 nm. O ácido gálico foi usado como padrão e os resultados estão expressos em equivalentes de ácido gálico.

2.3. Análise de dados

Os métodos utilizados são descritos em normas analíticas ou foram validados no laboratório. As análises foram efectuadas em duplicado para despistar erros aleatórios. O tratamento dos dados foi efectuado através do programa Excel®.

3. Resultados

A actividade antioxidante das 25 amostras de leite foi avaliada através de três ensaios diferentes.

3.1. Determinação da actividade antiradicalar com DPPH'

Os resultados da actividade antiradicalar para os diferentes tipos de leite encontram-se representados na figura 1.

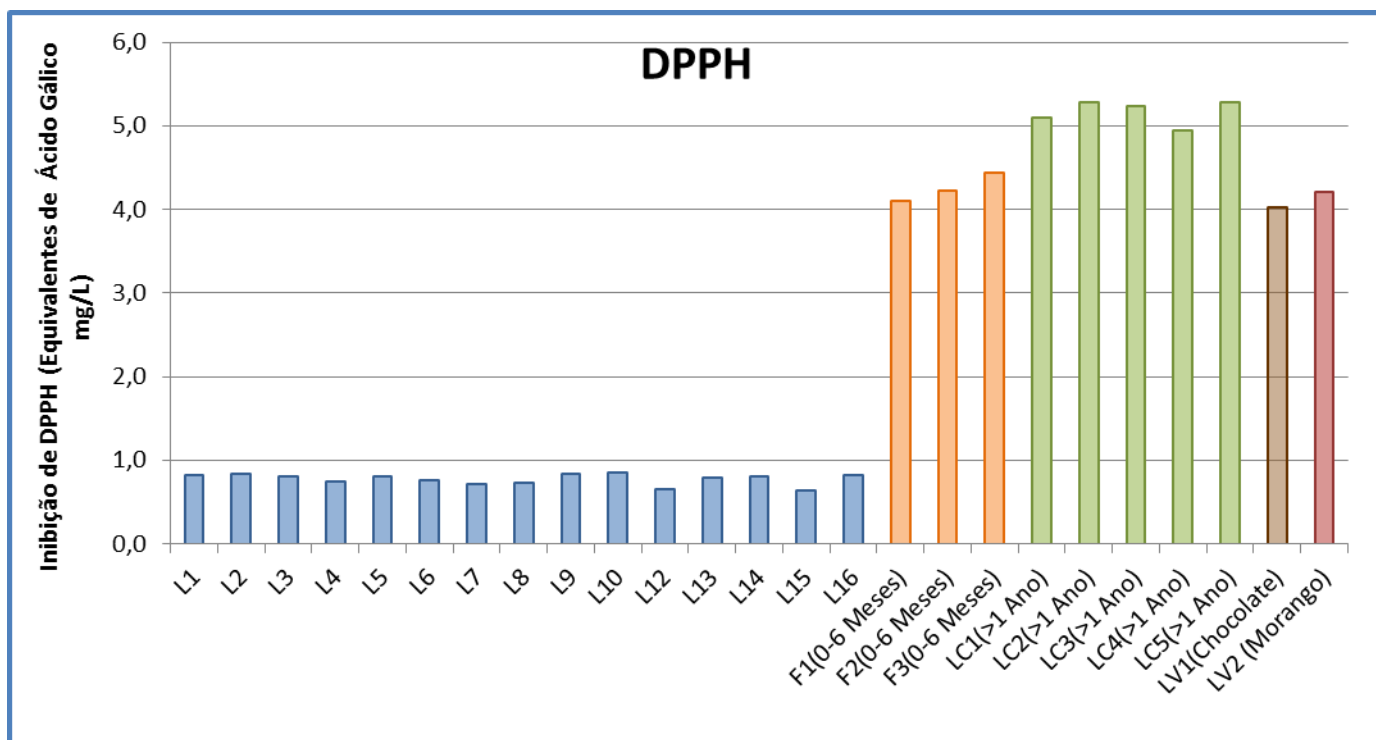


Figura 1 – Valores da inibição de DPPH’ em equivalentes de ácido gálico para os leites analisados

Os leites maternos apresentam resultados homogéneos assim como as fórmulas infantis entre si e os leites comerciais entre si. Podemos verificar que os leites comerciais e as fórmulas infantis apresentam em média uma maior inibição, logo são estes os leites que exibem maior actividade antioxidante em comparação com o leite materno. As amostras de leite materno apresentam uma actividade antioxidante homogénea sendo que, o L15 é o que apresenta menor AA e o L10 o que apresenta maior AA. As fórmulas apresentam uma AA similar entre as três amostras, sendo que a amostra F3 é a que tem maior AA. Os leites comerciais sem sabores também apresentam valores de inibição semelhantes entre si.

3.2. Actividade redutora do leite com FRAP

Os valores de actividade redutora do ião férrico para os diversos leites podem ser vistos na figura 2.

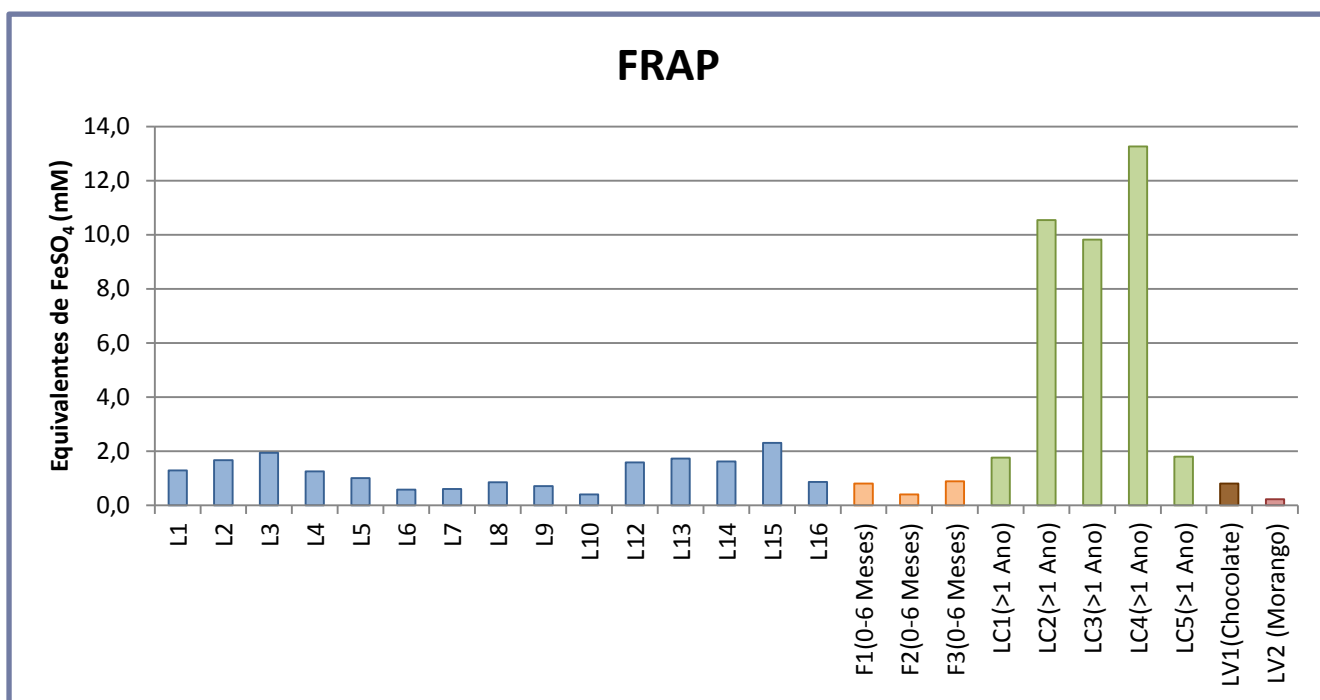


Figura 2 – Valores da actividade redutora em equivalentes de FeSO₄ para os leites avaliados

Verifica-se que o leite materno apresenta uma grande variabilidade de resultados, sugerindo a existência de vários factores que influenciem a composição do leite materno e, em consequência, a sua capacidade antioxidante. A composição do leite resulta de factores genéticos, do estado metabólico da mulher, da dieta e da altura do dia.

Podemos verificar que três dos leites de crescimento (LC2, LC3, LC4) exibem valores muito mais elevados que os restantes e que o leite materno e as fórmulas infantis, pois são leites fortificados com várias vitaminas.

3.3. Compostos fenólicos totais pelo ensaio de Folin-Ciocalteu

Os resultados obtidos para a composição fenólica total estão representados na figura 3.

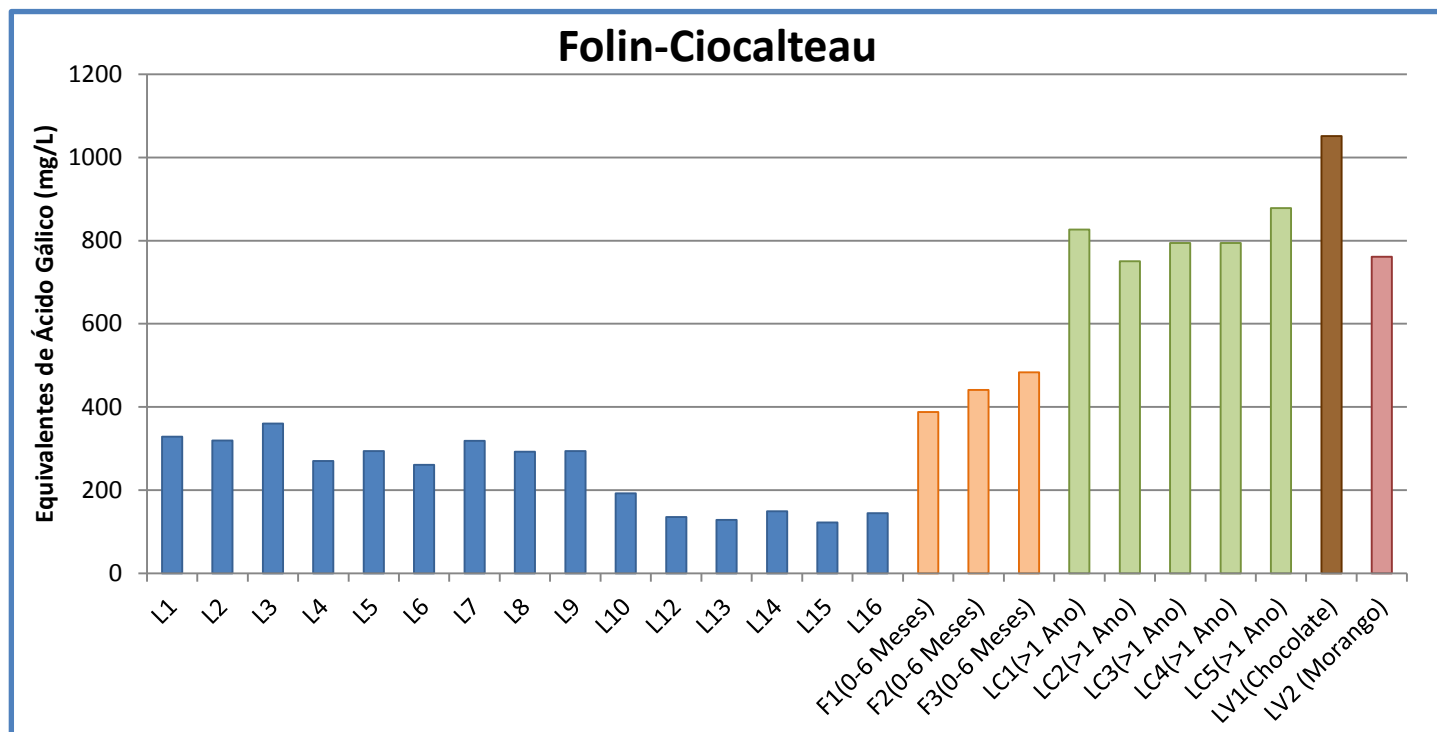


Figura 3 – Valores de compostos fenólicos totais em equivalentes de ácido gálico para os leites estudados.

Verifica-se maior variabilidade entre os leites maternos que entre os restantes tipos de leite e também que os primeiros apresentam valores mais reduzidos de compostos fenólicos totais que os leites comerciais e as fórmulas. Comparando as fórmulas infantis, com o leite de vaca, observa-se que este último apresenta maior teor de compostos fenólicos totais.

4. Discussão

O leite humano contém hormonas, factores imunológicos, factores de crescimento, enzimas e células viáveis, componentes esses que, na maioria, não podem ser adicionados às fórmulas infantis (Carver, 2003). Neste trabalho foi dada particular

importância àqueles componentes que manifestam actividade antioxidante, tendo essa actividade sido analisada quer em leites humanos quer em leites comerciais (fórmulas infantis e leite de vaca destinado a crianças). A actividade antioxidante foi avaliada através de dois ensaios diferentes e relacionada com o teor em compostos fenólicos dos diversos leites. O ensaio do DPPH[•] mede a capacidade de sequestrar um radical estável pelos antioxidantes presentes na amostra, enquanto no método FRAP se mede a capacidade de reduzir o catião férrico apresentada pelos antioxidantes da amostra. Embora ambos os métodos se baseiem em processos de transferência electrónica, é frequente produzirem resultados diferentes, dado que as moléculas (com actividade antioxidante) alvo diferem para os dois métodos (Cao, Prior, 1998).

Comparando os ensaios, verifica-se uma clara diferença entre todos os tipos de leite comercial e os leites humanos no ensaio com DPPH[•], enquanto no ensaio FRAP, apenas três leites comerciais divergem claramente dos restantes. Tal divergência poderá ser explicada pelo facto de o ensaio FRAP não ser sensível às enzimas, com actividade antioxidante, presentes no leite materno, nem a compostos pouco hidrossolúveis como muitos polifenóis (Apak *et al.*, 2007). Os três leites comerciais que apresentam forte actividade neste ensaio poderão ter na sua composição catiões metálicos e/ou outros compostos antioxidantes hidrossolúveis. Esta explicação é suportada pelos estudos que indicam que o ensaio com DPPH[•] correlaciona-se melhor com o teor em antioxidantes fenólicos (Floegel *et al.*, 2011) e pela comparação dos resultados de ambos os ensaios com os do teste de Folin-Ciocalteu que, tal como o ensaio com DPPH[•], apresenta uma clara diferença entre os leites maternos e os restantes.

As diferenças existentes, entre os diversos leites maternos analisados, poderão reflectir as diferenças entre as dietas consumidas pelas lactantes. Segundo Oveisi *et al.*, 2010, uma dieta rica em alimentos que contenham antioxidantes implica uma maior capacidade antioxidante do leite materno.

Embora o teste FRAP seja vulgarmente utilizado na avaliação do poder redutor de leite materno, tal não parece ser adequado pois, como referido anteriormente, este ensaio não é sensível a vários agentes antioxidantes que se sabe existirem no leite materno. Já o ensaio com DPPH[•] é sensível a outros agentes antioxidantes, entre os quais compostos

fenólicos, mas não só, a avaliar pelos perfis algo diferentes quando se comparam os dados representados nas figuras 1 e 3. No entanto, este ensaio também apresenta algumas desvantagens, quando aplicado a leites, pois só mede compostos solúveis em álcoois e apresenta maior sensibilidade a pequenas moléculas (Apak et al., 2007).

Tendo em conta que no nosso organismo existem diversos iões metálicos, num equilíbrio entre a forma reduzida e a forma oxidada, que podem actuar como agentes pró-oxidantes e que a ingestão de alimentos ricos em compostos antioxidantes e especificamente com poder redutor permite evitar o aumento da concentração de iões capazes de provocar danos em biomoléculas como lípidos ou ácidos nucleicos (Caicedo *et al.*, 2008) será importante ter disponível um método capaz de quantificar tais agentes antioxidantes, quer em alimentos, quer em fluídos biológicos.

Os resultados obtidos para compostos fenólicos totais serão justificados pela alimentação das vacas, à base de vegetais ricos em compostos fenólicos enquanto a alimentação das lactantes é mais variada e não exclusivamente vegetariana. As fórmulas embora elaboradas à base de leite de vaca, sofrem modificações a nível da composição para tornar a sua digestão mais fácil, pois os bebés só estão aptos a digerir leite de vaca normal depois do primeiro ano de vida (Institute of Medicine, 2004). Essa modificação reflectir-se-á numa redução do teor em compostos fenólicos.

Pode verificar-se, a partir dos resultados obtidos dos testes de FRAP e de DPPH[•] que uma actividade de redução férrica não implica a existência de uma actividade antiradicalar, mas em média as fórmulas infantis têm maior actividade antiradicalar que os leites maternos. Sendo os testes de DPPH[•] e FRAP diferentes, na informação que fornecem, são testes que se complementam. No entanto, não é prático utilizar mais do que um ensaio analítico, quando se pretende avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra complexa, sendo desejável encontrar outro tipo de análise que forneça informação mais completa.

Este estudo teve algumas limitações, pois para além da dieta, a actividade antioxidante é influenciada pelo estilo de vida, por factores genéticos e por exposição a poluentes específicos. Estes factores podem provocar alterações significativas nos parâmetros

testados, podendo mesmo alguns destes efeitos sobrepor-se à influência da dieta. Por este motivo, é necessário utilizar um número elevado de amostras para se poder avaliar a variabilidade dos parâmetros seleccionados sendo assim esta a principal limitação deste trabalho. Nesse sentido, seria interessante poder correlacionar os dados obtidos com informação sobre estilos de vida e hábitos alimentares das lactantes participantes no estudo.

Seria interessante também, aplicar a mesma metodologia a leites de lactantes vegetarianas para comparar e ver as diferenças a nível de compostos fenólicos totais, com o leite de lactantes com uma dieta não exclusivamente vegetariana.

É também um factor limitante, a cooperação das dadoras na disponibilização do leite em regime gratuito.

Conclusão

Os resultados obtidos indicam a existência de diferenças na capacidade antioxidante entre o leite materno e os leites comerciais utilizados na alimentação de bebés, sendo que os ensaios utilizados indicam que estes últimos apresentam uma mais elevada capacidade, possivelmente como resultado da suplementação destes leites comerciais com diversos componentes exibindo actividade antioxidante.

O estudo reforça a noção de que diferentes ensaios de actividade antioxidante poderão dar indicações diferentes, dado serem sensíveis a diferentes compostos. Em amostras complexas, como é o caso do leite, essa diferença é evidente.

Será, portanto, desejável que a comunidade científica possa dispor de ensaios capazes de medir, de uma forma fidedigna e reproduzível, a capacidade antioxidante em amostras complexas, como os fluidos biológicos e diversos alimentos, de modo a ser possível utilizar essa informação para benefício das populações.

Bibliografia

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., E., Bektaşoğlu, B., Berker, K., I. e Özyurt, D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.

Ávila, Rita. (2004). "Aleitamento da criança no primeiro ano de vida". Revista Portuguesa de Clínica Geral;20:339-46.

Azeredo, V. B. de, N. M. F. Trugo. (2008). "Retinol, carotenoids, and tocopherols in the milk of lactating adolescents and relationships with plasma concentrations" *Nutrition* 24 133–139.

Benzie, F.F. and Strain, J.J. (1999). Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods in enzymology*. Vol. 299:15-23.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*;28:25–30.

Brown, J. E., Isaacs, J. e Wooldridg, N. H. (2007). "Nutrition through the Life Cycle" (3º ed.).

Cao, Prior (1998)

Caicedo, M., Jacobs, J.J., Reddy, A., Hallab, N. J. (2007). Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T-cells demonstrates Ni²⁺ and V³⁺ are more toxic than other metals: Al³⁺, Be²⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Mo⁵⁺, Nb⁵⁺, Zr²⁺. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.

Carver JD. (2003). "Advances in nutritional modifications of infant formulas." *Am J Clin Nutr*;77:1550S– 4.

Fagoel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S. I., Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:1043–1048.

Institute of Medicine (U.S.). (2004) “Infant Formulas: Evaluating the Safety of new ingredients”. *National Academies Press*.

Kasapović, J., S. Pejić, M. Mladenović, N. Radlović, S. B. Pajović (2005). “Superoxide dismutase activity in colostrum, transitional and mature human milk” *The Turkish Journal of Pediatrics* 47:343-347.

L’Abbe, M. R., J. K. Friel. (2000). “Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Content of Human Milk From Mothers of Premature and Full-Term Infants During the First 3 Months of Lactation” *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 31:270–274.

Levy, L. e Bértolo, H. (2008) Manual de aleitamento materno: Edição do Comité Português para a UNICEF/Comissão Nacional Iniciativa Hospitais Amigos dos Bebés. Edição Revista.

Li, W., Hosseinian, F. S., Tsopmo, A., Friel, J. K., Beta, T. (2009). “Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk” *Nutrition* 25: 105 – 114.

Lonnerdal, Bo. (1986). “Effects of Maternal Dietary Intake on Human Milk Composition” *Journal of Nutrition* 116: 499-513.

Oveisi, M. R., Sadeghi, N., Jannat, B, Hajimahmoodi, M., Behfar Abd-ol-Azim, Jannat, F., Nasab, F.M. (2010). “Human Breast Milk Provides Better Antioxidant Capacity than Infant Formula”. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9 (4): 445-449.

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

Shoji H, Shinohara K, Oguchi S, Shiga S, Yamashiro Y.(2004)” Suppressive effects of breast milk on oxidative DNA damage in very low birthweight infants”. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 89: F136–8.

Tijerina-Sáenz, A., S.M. Innis, D.D. Kitts (2009). “Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and E and fatty acid composition” *Acta Pædiatrica* ISSN 0803 – 5253.

Zarban, A., F. Taheri, T. Chahkandi, G. Sharifzadeh, M. Khorashadizadeh. (2009). “Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Human Colostrum, Transitional and Mature Milk” *J. Biochem. Nutr.* 45: 150-154.