



ORIGINAL BREVE

## Medida por crematocrito del contenido calórico de la leche materna donada congelada<sup>☆</sup>

S. Vázquez-Román\*, C. Alonso-Díaz, N.R. García-Lara, D. Escuder-Vieco y C.R. Pallás-Alonso

Servicio de Neonatología, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid, España

Recibido el 11 de julio de 2013; aceptado el 5 de septiembre de 2013

Disponible en Internet el 4 de diciembre de 2013

### PALABRAS CLAVE

Leche materna donada;  
Contenido graso;  
Contenido energético;  
Crematocrito;  
Congelación

### KEYWORDS

Donor human milk;  
Lipid content;  
Caloric content;  
Crematocrit;  
Freezing

### Resumen

**Objetivo:** Determinar, mediante crematocrito, las modificaciones del contenido graso de la leche materna cruda y pasteurizada a lo largo de 3 meses de congelación.

**Método:** Se analizó la evolución del crematocrito (fórmula de Lucas) en leche cruda y pasteurizada a lo largo de 3 meses de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Resultados:** La grasa en leche cruda ( $n=44$ ) fue 3,19 g/dl al inicio y 2,86 g/dl a los 3 meses de congelación ( $p=0,02$ ). En leche pasteurizada ( $n=36$ ), al inicio fue 2,59 g/dl y 2,20 g/dl al mes de congelación ( $p=0,01$ ), posteriormente, hasta los 3 meses, no hubo cambios significativos. Se observó variabilidad en los valores intermedios.

**Conclusiones:** Se observó una disminución en la medida de la grasa tras congelación en leche cruda y pasteurizada. La congelación no impide la acción de la lipasa y también afecta al glóbulo de grasa. Probablemente, el crematocrito no sea el método óptimo para cuantificar la grasa en leche ya procesada.

© 2013 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Effect of freezing on the "crematocrit" measurement of the lipid content of human donor milk

#### Abstract

**Objective:** To determine, by the crematocrit measurement, the effect on the fat content of raw and pasteurized donor milk of freezing during 3 months at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Methods:** The evolution of the crematocrit measurement (following Lucas technique) on frozen ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), raw and pasteurized human milk, was analyzed during 3 months.

<sup>☆</sup> Presentación previa: enviado como comunicación para miembro numerario en el XXIV Congreso de Neonatología y Medicina Perinatal, previsto para octubre del 2013 en Barcelona.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [sara.vazquezroman@gmail.com](mailto:sara.vazquezroman@gmail.com) (S. Vázquez-Román).

**Results:** The fat content of raw milk (n=44) was 3.19 g/dl at the beginning and 2.86 g/dl after 3 months frozen (p=0.02). In pasteurized milk (n=36) fat content at the first determination was 2.59 g/dl and 2.20 g/dl after 1 month frozen (p=0.01). Afterwards there were no significant changes up to 3 months frozen. Variability was observed in the intermediate values.

**Conclusions:** A reduction on the fat content measurement of raw and pasteurized donor human milk after freezing was observed. Freezing does not inactivate the milk lipase but does destroy the fat globule. Creamatocrit measurement may not be the best method to determine the fat content of processed human milk.

© 2013 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

La leche materna es el alimento ideal para los recién nacidos, especialmente si son prematuros o están enfermos<sup>1-4</sup>, pero sus propiedades pueden alterarse durante su manipulación y almacenaje.

La congelación de la leche materna a  $-20^{\circ}\text{C}$  garantiza su calidad microbiológica pero los efectos en la calidad nutricional han sido poco investigados. Existen estudios que han observado una disminución en la capacidad bactericida y antioxidante de la leche materna<sup>5-7</sup> y una reducción en la medida del contenido calórico y graso con el tiempo de congelación<sup>8</sup>.

En ocasiones, el contenido nutricional de la leche materna no es suficiente para alcanzar las necesidades de los recién nacidos prematuros y/o de bajo peso<sup>9</sup>, por ello es importante conocer su valor nutritivo. Los lípidos representan la principal fuente de energía, pero es el componente que mayores variaciones presenta<sup>10</sup>. El crematocrito es un método sencillo y barato para calcular el contenido lipídico y calórico de la leche materna. Fue descrito por Lucas et al.<sup>11</sup> en 1978. Varios autores han encontrado una buena correlación entre el valor calórico de la leche y el crematocrito<sup>12-14</sup>.

El objetivo de nuestro estudio fue determinar, mediante el uso del crematocrito, las modificaciones del contenido graso de la leche materna cruda y pasteurizada a lo largo de 3 meses de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Material y métodos

Estudio experimental. Las muestras las proporcionaron las mujeres donantes del Banco de Leche, previo consentimiento informado. Fueron extraídas manualmente o con sacaleches y se almacenaron en botes de cristal esterilizados.

Las muestras de leche cruda (no pasteurizada) se refrigeraron a  $4-5^{\circ}\text{C}$  tras la extracción durante un máximo de 24 h. En esas primeras 24 h, las muestras se homogeneizaron mediante 10 balanceos en forma de arco y se dividieron en 7 alícuotas. Se realizó el primer análisis (tiempo 0) y las 6 alícuotas restantes se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras de leche pasteurizada, inmediatamente después de la pasteurización Holder, se homogeneizaron mediante 10 balanceos en forma de arco y se dividieron en

7 alícuotas. Se realizó el primer análisis tras la pasteurización y las 6 alícuotas restantes se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las alícuotas, tanto de la leche cruda como de la pasteurizada, se almacenaron en tubos de polipropileno y se identificaron en base al tiempo de congelación (7, 14, 21, 30, 60 o 90 días).

Para ser analizadas las alícuotas, se descongelaron al baño maría a  $40^{\circ}\text{C}$  hasta que quedase un bloque central congelado y posteriormente en el frigorífico a  $4-5^{\circ}\text{C}$ .

## Análisis del crematocrito

Se reprodujo la técnica de Lucas<sup>11</sup>. Se calentó cada alícuota al baño maría a  $40^{\circ}\text{C}$  durante 10 min y se homogeneizó con un agitador tipo Vortex<sup>®</sup>. De cada alícuota se extrajeron para realizar el crematocrito 3 capilares de  $75\ \mu\text{l}$ , sellados en un extremo y se centrifugaron durante 15 min a 12.000 rpm en una centrífuga Hettich<sup>®</sup> para hematocrito.

Se midieron, con una regla milimetrada, las columnas de crema y suero. El crematocrito se expresó como el porcentaje de crema con respecto a la longitud total de la columna. Se calculó la media de los 3 crematocritos y, mediante la fórmula de Lucas, el contenido graso (%crema-0,59)/0,146 = g/l y energético (% crema  $\times$  66,8  $\times$  290 = Kcal/l).

## Métodos estadísticos

Tamaño muestral: se realizó un estudio piloto previo. La diferencia en el contenido graso que se encontró fue de 0,7g en leche cruda y 0,5g en leche pasteurizada. El tamaño muestral requerido para detectar esa diferencia, con un poder del 80% y un nivel de confianza del 95%, fue de 39 muestras de leche cruda y 34 de leche pasteurizada.

Para la descripción de las variables continuas, se empleó la media  $\pm$  desviación estándar. La proporción de muestras estudiadas con 1,2 o 3 crematocritos se expresó mediante porcentajes. Para evaluar las diferencias en el contenido graso y calórico entre el momento inicial y los diferentes tiempos de congelación, se utilizó el test estadístico t de Student para datos pareados. Se comprobó la normalidad de la distribución de los datos con el test de Kolmogorov-Smirnov.

**Tabla 1** Número y porcentaje de alícuotas de leche cruda en las que se realizaron 1, 2 o 3 análisis del crematocrito en cada momento de estudio

	Inicio (N = 44)	7 días (N = 44)	14 días (N = 44)	21 días (N = 44)	30 días (N = 44)	60 días (N = 44)	90 días (N = 44)
1 análisis	3 (6,82%)	4 (9,09%)	0	2 (4,55%)	0	5 (11,36%)	3 (6,82%)
2 análisis	11 (25%)	13 (29,55%)	11 (25%)	12 (27,27%)	13 (29,55%)	4 (9,09%)	14 (31,82%)
3 análisis	30 (68,18%)	27 (61,36%)	33 (75%)	30 (68,18%)	31 (70,45%)	35 (79,55%)	27 (61,36%)

**Tabla 2** Comparación del contenido de grasa y contenido calórico en leche cruda (N = 44) según el tiempo de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ 

	Inicio	7 días	14 días	21 días	30 días	60 días	90 días
Grasa (g/dl)	3,19 ± 1,44	2,75 ± 1,31	2,92 ± 1,29	2,81 ± 1,47	2,72 ± 1,29	2,72 ± 1,49	2,82 ± 1,62
Contenido calórico (Kcal/l)	640,05 ± 140,60	597,32 ± 127,40	613,74 ± 125,80	603,52 ± 143,44	594,47 ± 126,16	595,04 ± 145,45	604,39 ± 157,61
		p < 0,001	p = 0,040	p = 0,011	p < 0,001	p = 0,003	p = 0,020
		p < 0,001	p = 0,040	p = 0,011	p < 0,001	p = 0,003	p = 0,020

Se muestran la media ± desviación estándar y el análisis con t de Student pareado.

**Tabla 3** Número y porcentaje de alícuotas de leche pasteurizada en las que se realizaron 1, 2 o 3 análisis del crematocrito en cada momento de estudio

	Inicio (N = 36)	7 días (N = 36)	14 días (N = 36)	21 días (N = 36)	30 días (N = 36)	60 días (N = 36)	90 días (N = 36)
1 análisis	2 (5,56%)	1 (2,78%)	1 (2,78%)	0	0	4 (11,11%)	2 (5,56%)
2 análisis	3 (8,33%)	2 (5,56%)	3 (8,33%)	3 (8,33%)	5 (13,89%)	2 (5,56%)	14 (38,89%)
3 análisis	31 (86,11%)	33 (91,67%)	32 (88,89%)	33 (91,67%)	31 (86,11%)	30 (83,33%)	20 (55,56%)

## Resultados

Se recogieron 44 muestras de leche donada cruda. En la [tabla 1](#) se muestran el número y porcentaje de alícuotas de leche cruda en las que se realizaron 1, 2 o 3 crematocritos.

La media ± desviación estándar del contenido graso al inicio fue de 3,19 ± 1,44 g/dl y del contenido energético de 640,05 ± 140,60 kcal/l. Se observó una reducción significativa de la medida del contenido graso y energético tras la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  en todos los momentos del análisis (7, 14, 21, 30, 60 y 90 días) ([tabla 2](#)).

Se recogieron 36 muestras de leche donada pasteurizada. En la [tabla 3](#) se muestran las alícuotas en las que se realizaron 1, 2 o 3 crematocritos.

La media del contenido graso al inicio del estudio fue de 2,59 ± 1,17 g/dl y del contenido energético fue de 581,56 ± 114,04 kcal/l. Se observó una reducción significativa de la medida del contenido graso y energético tras la congelación a  $-20^{\circ}$  durante el primer mes de estudio (7, 14, 21 y 30 días) ([tabla 4](#)).

## Discusión

Nuestro estudio muestra una disminución del contenido graso y calórico medido por el crematocrito en leche materna cruda y pasteurizada tras la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Esta reducción fue significativa durante los 3 meses de estudio en leche cruda y solo hasta el primer mes en leche pasteurizada. Ningún estudio previo ha evaluado el cambio del crematocrito, tanto en leche cruda como pasteurizada a lo largo de 3 meses de congelación.

Existen varios trabajos que describen un aumento de la actividad de la lipasa de la leche durante la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ <sup>15-17</sup>. La lipólisis produce hidrólisis de los triglicéridos, de tal forma que aumentan los ácidos grasos libres en la leche y se reduce la columna de crema. Esto justificaría los hallazgos en relación con la disminución del contenido graso y calórico medido por crematocrito en la leche cruda desde el inicio hasta los 3 meses de congelación. En nuestro estudio, se ha visto también que la reducción en la medida del contenido de grasa en leche pasteurizada solo ocurre durante el primer mes. Se ha descrito que la pasteurización disminuye la actividad de las lipasas<sup>18</sup>; la menor hidrólisis de triglicéridos podría explicar que la reducción de la columna de crema sea menor en la leche pasteurizada que en la cruda.

Por lo tanto, aunque probablemente durante la congelación el contenido total de grasa no varía, surgen cambios en el glóbulo de grasa que alteran la medida del crematocrito. Lucas et al.<sup>11</sup> ya describieron que esta rotura del glóbulo de grasa podría provocar una falsa disminución del crematocrito, aunque en su estudio no observaron cambios

**Tabla 4** Comparación del contenido de grasa y contenido calórico en leche pasteurizada (N = 36) según el tiempo de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ 

	Inicio	7 días	14 días	21 días	30 días	60 días	90 días
Grasa (g/dl)	2,59 ± 1,17	2,18 ± 1,04	2,00 ± 1,09	1,95 ± 1,03	2,20 ± 0,96	2,59 ± 1,68	2,76 ± 2,09
Contenido calórico (Kcal/L)	581,56 ± 114,04	541,96 ± 101,79	524,11 ± 106,48	520,03 ± 100,78	543,71 ± 93,53	581,69 ± 163,83	598,40 ± 204,01
		p = 0,015	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,010	p = 0,996	p = 0,580
		p = 0,015	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,010	p = 0,996	p = 0,580

Se muestran la media ± desviación estándar y el análisis con t de Student pareado.

significativos en el crematocrito tras la congelación durante 2 meses. Por el contrario, otros autores<sup>14</sup> describieron una disminución del crematocrito tras 7 días de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; en este estudio, la correlación entre el crematocrito y el contenido lipídico y calórico seguía siendo alta pero planteaban la necesidad de crear otra ecuación para calcular con más exactitud el contenido energético en la leche congelada.

Los valores intermedios que se muestran en nuestro estudio, tanto en leche cruda como en leche pasteurizada, no se explican fácilmente y ponen de manifiesto las limitaciones del crematocrito para medir la grasa en leche que ya ha sido procesada.

La principal limitación de este trabajo es que, por problemas técnicos, no se consiguió medir en todos los casos el crematocrito por triplicado, como indica la técnica de Lucas<sup>11</sup>, aunque otros estudios han utilizado el crematocrito por duplicado con buenos resultados<sup>19,20</sup>.

Por todo lo comentado anteriormente, consideramos que el crematocrito, aunque es un método de fácil disponibilidad en las unidades neonatales, no es un método óptimo para medir el contenido de grasa en leche que ha sido previamente procesada. Una opción sería modificar la ecuación de Lucas<sup>11</sup> cuando se utilice en leche congelada o pasteurizada o bien utilizar otros métodos de medida más válidos.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O'Hare D, Schanler RJ, et al., American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 2005;115:496–506.
- WHO. Infant and young child nutrition. Global strategy on infant and young child feeding. Report by the Secretariat. Fifty-fifth World Health Assembly. A55/15. 16 April 2002. Geneva.
- Hernandez-Aguilar MT, Aguayo-Maldonado J. Cómo promover y apoyar la lactancia materna en la práctica pediátrica. *An Pediatr (Barc)*. 2005;63:340–56.
- Bertino E, Giuliani F, Occhi L, Coscia A, Tonetto P, Marchino F, et al. Benefits of donor human milk for preterm infants: current evidence. *Early Hum Dev*. 2009;85:9–10.
- Takci S, Gulmez D, Yigit S, Dogan O, Dik K, Hascelik G. Effects of freezing on the bactericidal activity of human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;55:146–9.
- Akinbi H, Meinen-Derr J, Auer C, Ma Y, Pullum D, Kusano R, et al. Alterations in the host defense properties of human milk following prolonged storage or pasteurization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51:347–52.
- Hanna N, Ahmed K, Anwar M, Petrova A, Hiatt M, Hegvi T. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004;89:F518–20.
- García-Lara NR, Escuder-Vieco D, García-Algar O, De la Cruz J, Lora D, Pallás-Alonso C. Effect of freezing time on macronutrients and energy content of breastmilk. *Breastfeed Med*. 2012;7:295–301.
- Heird WC. Determination of nutritional requirements in pre-term infants, with special reference to catch-up growth. *Semin Neonatol*. 2001;6:365–75.
- Hibberd CM, Broke OG, Carter ND, Haug M, Harzer G. Variation in the composition of breast milk during the first 5 weeks of lactation: Implications for the feeding of preterm infants. *Arch Dis Child*. 1982;57:658–62.
- Lucas A, Gibbs JAH, Lyster RLJ, Baum JD. Creamatocrit: Simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *Br Med J*. 1978;1:1018–20.
- Lemons JA, Schreiner RL, Greshman EL. Simple method for determining the caloric and fat content of human milk. *Pediatrics*. 1980;66:626–8.
- Hundrieser KE, Clark RM, Jensen RG, Ferris AM. A comparison of methods for determination of total lipids in human milk. *Nutr Res*. 1984;4:21–6.
- Wang CD, Chu PS, Mellen BG, Shenai JP. Creamatocrit and the nutrient composition of human milk. *J Perinatol*. 1999;19:343–6.
- Clark RM, Fundraiser KH, Ross S, Brown PB. Effect of temperature and length of storage on serum-stimulated and serum-independent biolytic activities in human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1984;3:567–70.
- Bitman J, Larry Wood D, Mehta NR, Hamosh P, Hamosh M. Lipolysis of triglycerides of human milk during storage at low temperatures: A note of caution. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1983;2:521–4.
- Berkow SE, Freed LM, Hamosh M, Bitman J, Wood DL, Happ B, et al. Lipases and lipids in human milk: Effect of freeze-thawing and storage. *Pediatr Res*. 1984;18:1257–62.
- Henderson TR, Fay TN, Hamosh M. Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *J Pediatr*. 1998;132:876–8.
- Silprasert A, Dejsarai W, Feawvichit R, Amatayakul K. Effect of storage on the creamatocrit and total energy content of human milk. *Hum Nutr: Clin Nutr*. 1987;41:31–6.
- Chan MM, Hohara M, Chan BR, Curtis J, Chan GM. Lecithin decreases human milk fat loss during enteral pumping. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003;36:613–5.