

OTÁVIO AUGUSTO SILVA RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E BENEFICIAMENTO DO LEITE HUMANO
ORDENHADO DESCARTADO POR NÃO CONFORMIDADE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra

Coorientadores: Márcio Arêdes Martins
Maurício de Oliveira Leite

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R484c
2021
Ribeiro, Otávio Augusto Silva, 1984-
Caracterização nutricional e beneficiamento do
leite humano ordenhado descartado por não conformidade /
Otávio Augusto Silva Ribeiro. – Viçosa, MG, 2021.
108 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Jane Sélia dos Reis Coimbra.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 100-108.

1. Leite humano. 2. Leite - Processamento. 3. Ácidos
graxos. 4. Leite em pó. 5. Liofilização. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

CDD 22. ed. 637.1


OTÁVIO AUGUSTO SILVA RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E BENEFICIAMENTO DO LEITE HUMANO
ORDENHADO DESCARTADO POR NÃO CONFORMIDADE**

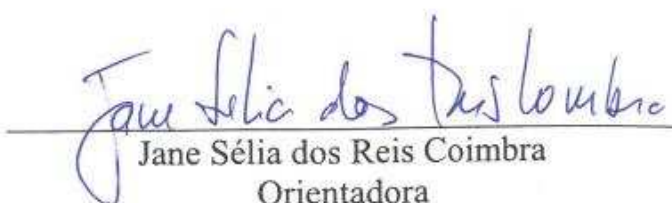
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 19 de março de 2021.

Assentimento:



Otávio Augusto Silva Ribeiro
Autor



Jane Sélia dos Reis Coimbra
Orientadora

Ofereço, com todo o meu amor, à Maraisa, que esteve sempre ao meu lado em todas as dificuldades. Seu companheirismo e dedicação me fizeram seguir sempre em frente e me ajudaram a continuar sem desanimar.

Aos meus filhos Joaquim e Olívia, razão de minha existência, a quem sempre com um simples olhar, sorrisos e ao ganhar um abraço, me davam forças e alegrias que preenchem todo o meu ser.

Aos meus pais, a quem devo tudo que sou hoje. Sempre foram meus exemplos, me ensinando e apoiando todos os dias em tudo que podiam e em tudo que precisei.

DECLARAÇÃO COVID

Devido a todas as restrições necessárias decorridas da pandemia de coronavírus que assola nosso país e o mundo todo, houve atrasos na realização de análises relacionadas à pesquisa que originou nesta tese de doutorado.

Desde a paralisação do semestre letivo, restrições de acesso a espaços da Universidade até o fechamento de laboratórios com retorno gradual e restritivo levaram a grandes dificuldades na conclusão deste trabalho que, mesmo tendo sido concluído, fica o sentimento de que muito mais poderia ter sido conquistado.

AGRADECIMENTOS

Não seria possível a conclusão desta tese sem o apoio e o auxílio de muitos que acompanharam o desenvolvimento desta pesquisa. Para estes citados a seguir, expresso meus mais sinceros agradecimentos.

Primeiramente, à professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, minha orientadora, que, com muita paciência, dedicação e confiança, me proporcionou não apenas o conhecimento necessário para condução e conclusão desta pesquisa, como também o exemplo de professora, profissional, pessoa e amiga. Exemplos estes que espero seguir em minha vida.

Aos meus coorientadores, os doutores Márcio Arêdes Martins e Maurício de Oliveira Leite, que com muita dedicação sempre estiveram dispostos e prontos para me ajudar em minhas dúvidas e dificuldades.

Aos colegas e amigos do LOP/LEMA, que estiveram sempre ajudando em minhas dúvidas e dificuldades, aos quais agradeço com extrema admiração e gratidão.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, por proporcionar a realização desta tão importante etapa em minha vida profissional.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV e, em especial, à técnica Cristiane, que foram responsáveis por partes cruciais das análises de microscopia que fazem parte desta tese.

À Universidade Federal do Acre, por todo o apoio e compreensão.

Aos colegas e amigos da UFAC, pelo apoio e auxílio.

À FIOCRUZ e aos amigos do grupo de pesquisa em leite humano, pelo apoio intelectual e auxílio na pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço, também, pelo apoio financeiro para a realização desta e de outras pesquisas com leite humano, às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG e PETROBRAS.

Agradeço por fim, mas como mais importante, a Deus, por toda a força e todas as conquistas que me proporcionou.

A todos, ofereço meu muito obrigado!

RESUMO

RIBEIRO, Otávio Augusto Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Caracterização nutricional e beneficiamento do leite humano ordenhado descartado por não conformidade.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Coorientadores: Márcio Arêdes Martins e Maurício de Oliveira Leite.

O leite humano é considerado o melhor e mais completo alimento para o lactente. O banco de leite humano (BLH) fornece o leite humano ordenhado (LHO) a neonatos que não possam ir ao seio materno. Em um BLH, o LHO é submetido a um tratamento térmico de pasteurização e então é congelado e armazenado a -18°C por até 6 meses. Até 50% desse LHO é descartado por se encontrar em não conformidade pela presença de sujidades físicas. Por este motivo propõe-se, no presente trabalho: (i) a caracterização do LHO não conforme por sujidades físicas; (ii) a quantificação de seus ácidos graxos livres durante seis meses de armazenamento; (iii) o beneficiamento do leite humano para obtenção de leite humano em pó, visando facilitar o seu armazenamento, transporte e aumento da sua vida de prateleira. Os resultados indicam a alta qualidade nutricional do LHO analisado, redução do teor de ácidos graxos (DHA e EPA) e de imunoglobulinas pelo processamento, boa dispersibilidade e qualidade nutricional no leite humano em pó. Assim, o LHO analisado pode ser utilizado para fabricação de leite humano em pó trazendo economia, praticidade e aproveitamento do leite que seria descartado devido à presença de pelos, mesmo com as ocorrências das perdas nutricionais devidas ao processamento e armazenamento do leite humano.

Palavras-chave: Ácidos graxos – leite humano. Leite desidratado. Liofilização – processamento.

ABSTRACT

RIBEIRO, Otávio Augusto Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2021. **Nutritional characterization and processing of milked human milk discarded for nonconformity.** Adviser: Jane Selia dos Reis Coimbra. Co-advisers: Márcio Arêdes Martins and Maurício de Oliveira Leite.

Human milk is considered the best and most complete food for infants. The human milk bank (HMB) provides expressed human milk (EHM) to newborns who are unable to go to the mother's breast. In an HMB, the EHM undergoes a pasteurization heat treatment and is then frozen and stored at -18°C for up to six months. Up to 50% of this EHM is discarded because it is not in compliance due to the presence of physical dirt. For this reason, it is proposed, in the present work: (i) the characterization of the EHM that does not conform due to physical dirtiness; (ii) the quantification of its free fatty acids during 6 months of storage); (iii) the processing of human milk to obtain powdered human milk, in order to facilitate its storage, transport and increase its shelf life. The results indicate the high nutritional quality of the EHM analyzed, a reduction in the content of fatty acids (DHA and EPA) and immunoglobulins through processing, good dispersibility and nutritional quality in human milk powder. Thus, the analyzed EHM can be used to manufacture powdered human milk bringing savings, practicality and use of milk that would be discarded due to the presence of dirt, even with the occurrence of nutritional losses due to the processing and storage of human milk.

Keywords: Fatty acids – human milk. Dehydrated milk. Lyophilization – processing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma 1 – Procedimentos realizados no BLH e os adotados na análise do LH.....	27
Fluxograma 2 – Desenvolvimento de produto leite humano em pó por secagem por atomização ou spray dryer.....	66
Fluxograma 3 – Desenvolvimento de produto LH em pó por liofilização.....	66
Figura 1 – Composição proteica do LHO (cromatógrafo de íons, separação por exclusão molecular, coluna SUPERDEX 75 e 280 nm).....	36
Figura 2 – Perfis proteicos SDS PAGE (30% T e 2,7% C): gel de concentração de 4,5% e gel de separação de 14%. Pool de leite humano na fase maduro, com 20 µg.....	37
Figura 3 – Cromatogramas obtidos por cromatografia de íons usando coluna Carb 2 para separação da mistura de padrões de açúcares, com fase móvel composta de hidróxido de sódio 200 ppm em água deionizada, 0,5mL/min.....	38
Figura 4 – Ácidos graxos saturados, MUFAs e PUFAs durante o tempo de armazenamento.....	58
Figura 5 – Variação nos níveis C6: 0 e C8: 0 durante 180 dias de armazenamento.....	60
Figura 6 – Variações nas composições dos ácidos graxos durante 180 dias de armazenamento.....	60
Figura 7 – Esquema de um spray dryer para a produção de leite em pó.....	67
Figura 8 – Esquema de um liofilizador para a produção de leite em pó.....	67
Figura 9 – Arranjo para análise de molhabilidade.....	71
Figura 10 – Leites em pó obtidos nos diferentes tratamentos.....	73
Figura 11 – Cromatograma das proteínas do leite humano em pó LHSD, LHL e LHEL (cromatografia de exclusão molecular com coluna SUPERDEX 75).....	75
Figura 12 – Perfis proteicos SDS PAGE (30% T e 2,7 % C): gel de concentração de 4,5% e gel de separação de 14%. Pool de leite humano na fase maduro, com 20 µg.....	76
Figura 13 – Análise cromatográfica da lactose no leite humano fluido e no leite humano em pó (cromatografia de íons com coluna CARB 2).....	79
Figura 14 – Teores de lactose do leite humano em pó comparado ao leite humano fluido não processado. Letras seguidas dos dados indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.....	80
Figura 15 – Micrografia leite humano em pó.....	83
Figura 16 – Micrografia leite humano em pó.....	85
Figura 17 – Micrografia leite humano em pó.....	86
Figura 18 – Distribuição do diâmetro do grão dos tratamentos para obtenção do leite em pó.....	87
Figura 19 – Diâmetros do leite humano em pó obtidos pelos tratamentos avaliados.....	88
Figura 20 – Distribuição de área do grão do leite em pó nos diferentes tratamentos.....	88
Figura 21 – Áreas dos grãos de leite humano em pó nos diferentes tratamentos.....	89

Figura 22 – Micrografia com mapeamento composicional por espectrometria de raio X por energia dispersiva (EDS).....	90
Figura 23 – Micrografia confocal do LHF	91
Figura 24 – Micrografia confocal do LHSD	92
Figura 25 – Micrografia confocal do LHL	93
Figura 26 – Micrografia confocal do LHEL.....	93
Figura 27 – Diâmetro das proteínas em cada tratamento	94
Figura 28 – Diâmetro das proteínas em cada tratamento	95
Figura 29 – Diâmetro do glóbulo de gordura em cada tratamento	95
Figura 30 – Diâmetro dos glóbulos de gordura em cada tratamento.....	96
Figura 31 – Espessura da membrana do glóbulo de gordura em cada tratamento	96
Figura 32 – Distribuição da espessura da membrana dos glóbulos de gordura em cada tratamento	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do leite humano em comparação com leites de outros mamíferos	18
Tabela 2 – Definição do leite humano por fases de lactação.....	19
Tabela 3 – Composição nutricional do leite humano não conforme, leite humano cru (LHC), leite humano pasteurizado (LHP) e leite humano homogeneizado-pasteurizado (LHHP)	35
Tabela 4 – Concentrações das proteínas no LHO em cada tratamento	36
Tabela 5 – Perfil lipídico do leite humano de 18 coletas e análise de diferenças entre a concentração de cada ácido graxo por coleta	40
Tabela 6 – Correlação de Pearson entre os ácidos graxos do leite humano analisado	43
Tabela 7 – Médias da composição de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, comparadas aos dados para regiões de 12 países	46
Tabela 8 – Composição dos ácidos graxos do leite humano em diferentes condições de processo e tempos de armazenamento.....	59
Tabela 9 – Macro e micronutrientes do leite humano fluido e desidratado	74
Tabela 10 – Teor de proteínas do leite humano cru e em pó.....	76
Tabela 11 – Composição de ácidos graxos do leite humano desidratado por spray dryer e liofilização	78
Tabela 12 – Propriedades do leite humano em pó.....	81
Tabela 13 – Distribuição percentual em massa dos minerais presentes no grão de leite humano em pó em cada tratamento	90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ARA	Ácido araquidônico
BLH	Banco de leite humano
DHA	Ácido decosa-hexanóico
LH	Leite humano
LHEL	Leite humano em pó obtido por evaporação seguida de liofilização
LHF	Leite humano fluido
LHL	Leite humano em pó obtido por liofilização
LHO	Leite humano ordenhado
LHOC	Leite humano ordenhado cru
LHOHP	Leite humano ordenhado homogeneizado-pasteurizado
LHOP	Leite humano ordenhado pasteurizado
LHSD	Leite humano em pó obtido por spray dryer
OMS	Organização Mundial da Saúde
RGBLH	Rede global de bancos de leite humano
UTI	Unidade de tratamento intensivo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA	15
1. INTRODUÇÃO	15
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo geral	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1. Leite humano	18
4.2. Banco de leite humano.....	20
4.3. Lipídios do leite humano	21
4.4. Alimentos para neonatos.....	22
4.5. Alimentos desidratados.....	22
4.5.1. Leite em pó (liofilização e spray dryer)	23
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DO LHO E DE SEUS ÁCIDOS GRAXOS	24
1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Amostras de leite humano.....	25
3.2. Delineamento experimental e análise estatística	27
3.3. Pasteurização	27
3.4. Homogeneização.....	28
3.5. Determinação da composição centesimal do LHO.....	28
3.5.1. Umidade.....	28
3.5.2. Proteínas brutas pelo método adaptado de micro Kjeldahl.....	29
3.5.3. Proteínas por cromatografia de exclusão molecular	29
3.5.4. Análise de eletroforese	30
3.5.5. Lipídios – método crematócrito.....	30
3.5.6. Lactose por cromatografia de íons.....	30
3.5.7. Açúcares totais.....	31
3.5.8. Resíduo mineral fixo (RMF) – método de incineração em mufla.....	31
3.5.9. Composição mineral	31

3.5.10. Acidez expressa em ácido lático.....	32
3.6. Caracterização dos ácidos graxos	32
3.6.1. Amostra.....	32
3.6.2. Extração dos lipídios.....	32
3.6.3. Derivatização	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Composição centesimal	34
4.2. Perfil de ácidos graxos do leite humano ordenhado	39
4.2.1. Ácidos graxos saturados (AGS).....	45
4.2.2. Ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs)	49
4.2.3. Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs)	50
5. CONCLUSÃO.....	52
CAPÍTULO 3 – INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO POOL DE LEITE HUMANO NÃO CONFORME.....	53
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
2.1. Amostra.....	54
2.2. Análise físico-química	55
2.3. Análise microbiológica	55
2.4. Pasteurização	55
2.5. Homogeneização.....	55
2.6. Extração de lipídios	56
2.7. Derivação	56
2.8. Análise de dados	57
3. RESULTADOS	57
3.1. Leite humano ordenhado cru	57
3.2. Leite humano pasteurizado e leite humano homogeneizado-pasteurizado.....	58
3.3. Correlações	61
4. DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÃO.....	63
CAPÍTULO 4 – BENEFICIAMENTO DO LHO NÃO CONFORME PELA PRESENÇA DE SUJIDADES, PARA OBTENÇÃO DE LHO EM PÓ.....	64
1. INTRODUÇÃO	64
2. OBJETIVOS	65
2.1. Objetivo geral	65

2.2. Objetivos específicos	65
3. MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1. Metodologias para obtenção do leite humano em pó	68
3.1.1. Concentração do LH	68
3.1.2. Análise do produto	69
3.1.2.1. Determinação dos teores de lactose e de proteínas por cromatografia de íons	69
3.1.2.2. Determinação do teor de umidade	70
3.1.2.3. Determinação do teor de molhabilidade (higroscopicidade) leite humano em pó	70
3.1.2.4. Determinação da solubilidade do leite humano em pó	71
3.1.2.5. Análise de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal	71
3.1.2.6. Análise do teor de ácidos graxos	72
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1. Caracterização centesimal do leite humano em pó	73
4.2. Proteínas	75
4.3. Lipídios	77
4.4. Ácidos graxos	77
4.5. Lactose	78
4.6. Qualidade do pó	80
4.7. Microscopia eletrônica de varredura	82
4.8. Espectrometria de raio X por energia dispersiva (EDS)	89
4.9. Microscopia confocal	91
5. CONCLUSÃO	98
CONCLUSÃO GERAL	99
REFERÊNCIAS	100

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

O leite humano é comprovadamente o melhor alimento para o lactente, mas em alguns casos a mãe não tem condições de amamentar o bebê como em casos de internações do recém-nascido em UTI neonatal, o que acontece em grande parte dos partos prematuros. Para estes casos, existe um banco de leite humano (BLH) que fornece leite humano ordenhado (LHO) obtido de doações de mães, submetidos a um processo de controle de qualidade e pasteurização e distribuídos a recém-nascidos prematuros sob prescrição médica, assim como a utilização do leite humano ordenhado da própria mãe quando possível.

O LHO, após sua coleta, é submetido a um processo de seleção e classificação e deve ser pasteurizado para eliminação de microrganismos patogênicos, ao fim deste processo realiza-se o controle de qualidade microbiológico sendo então congelado e armazenado a -18°C , para posterior utilização, com finalidade de evitar o crescimento microbiano. O armazenamento tem por prazo de validade de seis meses, o que pode vir causar alterações nos conteúdos nutricionais deste alimento, como por exemplo a oxidação de lipídios, que ocorre mesmo em armazenamento a temperaturas de congelamento.

Os lipídios representam uma importante fonte de energia para a alimentação, tornando-se necessário conhecer seu comportamento durante o armazenamento do LHO, o que poderia influenciar na qualidade deste alimento. O LHO é um produto altamente perecível, devido à sua alta umidade e elevados teores de nutrientes.

Tecnologias empregadas usualmente em leite bovino, visando aumentar sua vida de prateleira, como tecnologia de concentração e secagem do leite, a qual pela redução do teor de umidade causa uma diminuição em sua atividade de água (a_w), podem aumentar a sua vida de prateleira.

Poderia então com a utilização desta tecnologia, desenvolver um LHO em pó com a finalidade de estender sua vida de prateleira, assim como facilitar seu transporte e armazenamento, além de se obter um aditivo fortificante do LHO, a ser utilizado no próprio LHO, que seria utilizado em substituição dos aditivos artificiais encontrados no mercado.

Por indicação da Organização Mundial de Saúde (OMS), os bebês aos seis meses de idade devem iniciar a introdução alimentar, vindo a receber alimentos diferenciados do leite materno, que irão além de suprir a demanda de nutriente, acostumar o bebê a novos paladares e texturas de alimentos. Posteriormente, devem se alimentar da mesma maneira que os pais,

entretanto com a continuidade do aleitamento materno por livre demanda até os dois anos de idade.

Durante a recepção do LHO no BLH, este passa por um controle de qualidade, onde são avaliados parâmetros como a presença de sujidades, alterações na cor, aroma característico e acidez Dornic. O leite humano que se encontra não conforme com os padrões estabelecidos nas normas técnica do BLH é descartado (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ, 2005), podendo esta quantidade de descarte chegar a 50% do leite humano recebido.

Entretanto, com adaptação das tecnologias já existentes, pode-se desenvolver um produto no qual se utilize o leite humano, que seria até então descartado, podendo este compor um aditivo desenvolvido para atender as necessidades específicas de recém-nascidos prematuros e/ou de baixo peso ao nascer.

2. JUSTIFICATIVA

O leite materno é considerado o melhor alimento para o recém-nascido, pois provê ao mesmo os nutrientes que são fontes de energia e necessários para a estrutura do organismo, como lactose, lipídios e proteínas. Fornece ainda componentes necessários para o desenvolvimento do indivíduo, como minerais e vitaminas.

O leite humano disponibiliza também para o recém-nascido componentes como fosfolipídios e gangliosídios, que são necessários para o desenvolvimento do sistema imunológico e inflamatório, assim como da resposta do mesmo a injúrias e infecções.

Segundo a RDC 171/2006 (BRASIL, 2019), os Bancos de Leite Humano têm como critério prioritário para distribuição do leite humano pasteurizado: recém nascidos prematuros e/ou de baixo peso ao nascer, portadores de patologias, principalmente do trato gastrointestinal e sob prescrição médica ou do nutricionista.

No banco de leite humano, anteriormente às doações, é realizado um cadastro das doadoras, posteriormente passando por anamnese e então um treinamento onde se é explicado como deve se proceder os cuidados para a ordenha, armazenamento e transporte correto do LHO. Após a coleta do LHO, são realizadas análises sensoriais (embalagem, sujidades, off flavor e cor) e análises físico-químicas (Acidez Dornic e crematócrito). O LHO que se encontra em conformidade com os padrões do BLH após as análises, passa por um tratamento térmico de pasteurização a 62,5°C/30 min e em seguida por um controle de qualidade microbiológico. Posteriormente o leite humano é mantido congelado por até seis meses e, de acordo com a demanda, é repassado aos bebês. Durante o armazenamento este leite pode vir a sofrer

alterações em sua composição, pois mesmo com o congelamento ainda ocorrem reações como oxidação de lipídios. O que reduz sua qualidade nutricional. Por este motivo é necessário observar as alterações que ocorrem nos ácidos graxos do leite humano durante o tempo em que é mantido armazenado.

Um problema encontrado pelo banco de leite humano é o grande volume de leite que vem a ser descartado por estar não conforme com os padrões estabelecidos pela rede global de bancos de leite humano (rLH), como alguma sujidade física (pelos), alteração na acidez, aroma e cor, deixando o leite impróprio para o seu fornecimento. Uma alternativa sugerida neste trabalho é aproveitar este leite que é descartado e torná-lo viável para o consumo através de seu beneficiamento para torná-lo seguro para o consumo. Evitando assim o descarte deste leite e ampliando a possibilidade de garantir a segurança alimentar e nutricional dos recém-nascidos prematuros internados em UTIs Neonatal.

Visa-se então com este estudo o desenvolvimento de tecnologias para o beneficiamento do leite humano ordenhado que apresente não conformidade no processo de seleção e classificação, buscando obter um produto seguro que possa atender as necessidades nutricionais de recém-nascidos prematuros e/ou de baixo peso ao nascer, internados em UTIs Neonatal. O desenvolvimento de um produto obtido por técnicas de processamento que possam aumentar a vida de prateleira, facilitar o armazenamento e transporte do LHO e possibilitar a fortificação do leite oferecido aos neonatos pelo BLH.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar o perfil lipídico do LHO fornecido pelo BLH da cidade de Viçosa, MG, o comportamento de seus ácidos graxos durante o armazenamento e desenvolver uma tecnologia de beneficiamento para o aproveitamento de LHO não conforme.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o leite humano ordenhado não conforme quanto à sua composição centesimal de proteínas, lipídios, açúcares totais, açúcares redutores e resíduo mineral fixo.
- Caracterizar e quantificar os ácidos graxos presentes no leite humano e no produto desenvolvido.

- Observar alterações na composição e quantidade de ácidos graxos do leite humano durante o armazenamento por seis meses e no LHO beneficiado.
- Desenvolver tecnologia para o beneficiamento de leite humano ordenhado com finalidade de aumentar a vida útil do LHO.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Leite humano

O leite humano é comprovadamente o alimento mais adequado para a alimentação dos bebês, conferindo todos os constituintes necessários e balanceados para o bom desenvolvimento do mesmo devido à combinação de nutrientes essenciais e componentes bioativos (KIM; FRIEL, 2012), como carboidratos, sais, glóbulos de gorduras, proteínas em dispersão coloidal dentre outros (INNIS, 2007) havendo grande diferença entre este e os leites de outros mamíferos, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição do leite humano em comparação com leites de outros mamíferos

Tipos de leite	Energia (Kj)	Lipídios (g)	Lactose (g)	Proteínas (g)
Leite humano (BAUER; GERSS, 2011)	322	4,8	7,5	1,9
Leite de vaca (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2005)	290	4	4,6	3,3
Leite de cabra (KUCEVIC et al., 2016)	-	4,16	4,07	3,05
Leite de camela (AHMAD et al., 2012)	-	3,79	5,15	3,66

Médias da composição centesimal dos leites humano, de vaca, de cabra e de camela.

Este alimento atende a todas as necessidades nutricionais do bebê. É considerado mais que apenas um alimento nutritivo, pois contém componentes com atividades protetoras e imunomoduladoras, que conferem proteção contra alergias e infecções, além de estimular o desenvolvimento do sistema imunológico e maturação do sistema digestivo e neurológico (WEFFORT et al., 2012).

O aleitamento materno, quando exclusivo, auxilia no desenvolvimento da criança, seu ganho de peso, sua saúde e melhora também a saúde da mãe. Devido a esses benefícios, é

recomendado sua exclusividade até os seis meses de idade, pois esta prática diminui os riscos à saúde da criança, e proporciona o seu completo desenvolvimento (EIDELMAN; SCHANLER, 2012).

O leite humano pode ser dividido em diferentes fases de lactação como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2 – Definição do leite humano por fases de lactação

Tipo	Fases de lactação
Colostro	Leite obtido do 1º ao 5º dia após o parto
Leite Humano de Transição	Leite obtido do 6º ao 15º dia após o parto
Leite Humano Maduro	Leite obtido do 15º dia em diante após o parto

O leite humano também auxilia no desenvolvimento de bebês pré-termos, inclusive aos acometidos de doenças devidas à prematuridade. Essa classe de recém-nascidos exibiram um melhor ganho de peso e uma mais rápida recuperação quando alimentados com leite humano (PATEL; KIM, 2018). Deste modo, a sobrevivência de bebês pré-termo, em especial dos que necessitam de internações em unidade de tratamento intensivo (UTI neonatal), depende, juntamente com o tratamento específico, de um cuidado especial com a alimentação, sendo que para este fim o leite materno é considerado o melhor alimento, além de ser o mais aceito pelos bebês (SMITH; DOBBINS, 2014).

Pesquisas mostram que bebês alimentados com o leite materno exclusivo possuem uma melhor saúde, mais resistência a doenças e menores chances de adoecerem (INNIS, 2009, 2014; IP et al., 2009; PATEL; KIM, 2018).

IP et al. (2009) relataram que crianças que receberam o leite materno como alimento exclusivo por mais de três meses apresentaram redução de até 50% em quadros de otite e por mais de quatro meses, uma redução de até 72% em internações causadas por doenças relacionadas ao trato respiratório. Em crianças amamentadas, Isaacs et al. (2010) verificaram maior teor de massa branca em cérebros e Kim e Friel (2012) observaram o enriquecimento das membranas sinápticas terminais que exercem diversos papéis no desenvolvimento cerebral. Smith e Dobbins (2014) relatam a redução da incidência de enterocolites necrosante. Sullivan et al. (2010) observaram uma redução de 77% desta doença em bebês pré-termo quando comparados a crianças alimentadas com suplemento à base de leite de vaca.

Desta maneira, o aleitamento materno é considerado um tema de saúde pública e não apenas uma escolha de estilo de vida, pois auxilia no desenvolvimento neurológico e do organismo da criança. É recomendada sua exclusividade até os seis meses e sua continuidade até a idade de um ano ou mais dependendo do desejo conjunto da mãe e da criança (EIDELMAN; SCHANLER, 2012).

4.2. Banco de leite humano

Em casos de neonatos nascidos com baixo peso e/ou internados em UTIs Neonatal, o banco de leite humano acompanha a alimentação destes bebês, dando suporte para a correta alimentação e nutrição desses. Em situações em que o bebê não consegue ir ao seio da mãe quando internado nas unidades de tratamento intensivo neonatais, é utilizado para sua alimentação o LHO fornecido pelo BLH, o qual pode ser oriundo da própria mãe e/ou de doadoras (BRASIL, 2006). O BHL fornece leite humano ordenhado avaliado em sua qualidade físico-química e microbiológica, pasteurizado e congelado. Pode ser armazenado por até seis meses. O leite pode ser dividido nas fases de vida do bebê em Colostro (para os primeiros dias após o parto), leite de transição e leite maduro (BRASIL, 2006).

A Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (RBLH-BR) foi criada em 1998, pelo Ministério da Saúde juntamente com a Fundação Oswaldo Cruz, com o intuito e missão de promover o aleitamento materno, coletar e distribuir leite humano ordenhado de qualidade certificada além de contribuir para a diminuição da mortalidade infantil. A RBBLH distribui leite materno ordenhado para lactentes nascidos pré-maturos, internados em centros de tratamento intensivo e com orientação e apoio a amamentação. Conta com cerca de 200 bancos de leite humano distribuídos pelo território nacional e é reconhecida mundialmente pelo desenvolvimento tecnológico inédito e de baixo custo. A RBBLH brasileira é tida pela organização mundial de saúde (OMS) como a maior e mais complexa rede de bancos de leite do mundo (FIOCRUZ, 2019).

Durante a coleta do LHO, podem ocorrer contaminações físicas e/ou microbiológicas, devido à pelos e pele da doadora e algumas bactérias oriundas da doadora ou dos utensílios utilizados na extração e armazenamento do produto. A contaminação por substâncias físicas (pelo, pele, tecidos, plásticos), pode ser controlada com a filtração e a microbiológica com a pasteurização. Entretanto, mesmo com estes métodos de controle, o BLH descarta o leite que contenha algum traço de pelos ou pele da doadora para evitar risco ao bebê (FIOCRUZ, 2019).

O descarte do leite pode atingir até 50% do volume doado (ROZENDO et al., 2009), que é um valor muito alto.

Posto que as tecnologias de produção já elucidadas para diversos produtos lácteos podem reduzir a presença de contaminantes, pela inibição ou eliminação de microrganismos, e também manter as qualidades nutricionais dos produtos, busca-se uma tecnologia para o beneficiamento do produto não conforme, visando a redução do descarte do leite humano ordenhado. Uma possibilidade é o reaproveitamento dos lipídios do leite humano descartado somente por não conformidade física.

4.3. Lipídios do leite humano

A ingestão dos lipídios do leite humano fornece ácidos graxos essenciais e de 40 a 50% da energia necessária ao desenvolvimento do bebê (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006). A composição dos lipídios é de 98% de triacilglicerol, 0,8% de fosfolipídios, 0,5% de colesterol e de outros compostos (KIM; FRIEL, 2012).

Além da fração energética dos lipídios do leite humano, esses são fontes de ácidos graxos essenciais como linoleico e linolênico, insaturados como o oleico, e saturados como o palmítico, que desempenham papel importante no desenvolvimento do organismo do lactente (SUN et al., 2018).

Os ácidos graxos presentes no leite humano são provenientes do consumo e do metabolismo da gordura ingerida na dieta materna, além dos liberados do tecido adiposo e dos sintetizados no organismo da mãe pelo complexo enzimático de ácido graxo sintetase presente na glândula mamária. Deve-se salientar que os ácidos graxos linoleico e α -linolênico, não são sintetizados pela glândula mamária, e sim provenientes da dieta materna (KIM; FRIEL, 2012; INNIS, 2007). Assim, a dieta materna deve ser rica nestes ácidos graxos para que estejam disponíveis ao bebê no leite humano. Em países como o Japão e Philipinas, por exemplo, a alimentação é baseada em peixes marinhos que são uma fonte destes ácidos graxos (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006).

A oxidação de lipídios ocorre mesmo durante o armazenamento a frio. Este comportamento é prejudicial pois diminui a quantidade dos ácidos graxos essenciais (PRATT et al., 2011). A oxidação tem sua ocorrência aumentada em alimentos que passam por condições de estocagem e aquecimento (SUOMELA et al., 2017; GAWRYSIAK-WITULSKA et al., 2012), como ocorre com o leite humano quando pasteurizado.

Dentre os compostos formados pela oxidação de lipídios estão o pentanal, hexanal, octanal, nonanal, 2-octenal, dodecanal. O hexanal e o pentanal são oriundos da decomposição do ácido linoleico; o octanal e o nonanal da decomposição do ácido oleico (ELISIA; KITTS, 2011).

Devido à possibilidade de alterações no conteúdo dos lipídios do LHO durante seu armazenamento, é necessário conhecer o seu comportamento durante a estocagem, para que possam ser definidos os melhores métodos e tempos de armazenamentos para o LHO.

4.4. Alimentos para neonatos

De acordo com a Lei 11.265, de 3 de janeiro de 2006 (BRASIL, 2006), é recomendado o aleitamento materno como forma exclusiva de alimentação para lactentes de até seis meses de vida com alimentação complementar sendo mantida a amamentação até os dois anos de idade. Quando necessário a utilização de substituição ou complementação do aleitamento para lactentes, a mesma deve ser realizada com alimentos específicos para cada idade, devendo sempre seguir as orientações médicas (BRASIL, 2006).

4.5. Alimentos desidratados

A desidratação é utilizada com finalidade de aumentar a vida de prateleira do alimento sem que haja muitas alterações nele. Por secagem, sem a utilização de tratamentos térmicos severos, ocorre a diminuição da atividade de água devido à redução da quantidade de água no alimento (SCHUCK et al., 2009). Posto que uma elevada atividade de água em um substrato contribui para o crescimento microbológico e para a ocorrência de reações químicas e bioquímicas, a redução dessa faculto uma maior vida de prateleira do produto.

A atividade de água (A_w) é calculada pela relação entre a pressão de vapor da água de uma solução (P) e a pressão de vapor da água pura (P_o), $A_w = P/P_o$. A maioria dos microrganismos se desenvolvem bem em uma A_w acima de 0,9 enquanto praticamente não existe crescimento a uma A_w de 0,6, o que fornece então uma segurança ao alimento.

4.5.1. Leite em pó (liofilização e spray dryer)

O leite em pó é resultado da secagem do leite até um teor de 3 a 6% de umidade final, o que conduz a uma maior vida de prateleira ao leite. A A_w do leite de vaca está em torno de 0,2 (SCHUCK et al., 2005), o que impede o crescimento microbiológico e reduz a atividade enzimática devido à ausência de água livre no meio.

A secagem do leite por atomização, pulverização ou em spray dryer, ocorre após a concentração do leite. O leite concentrado escoia sob pressão por um pulverizador/atomizador e forma gotículas de aproximadamente 50 μm de diâmetro em uma câmara de secagem larga que se encontra preenchida por ar seco a uma temperatura entre 150°C e 200°C. As gotículas são aquecidas rapidamente devido à grande superfície de contato com o ar quente e atingem temperaturas abaixo de 100°C por alguns segundos. Por não ser um aquecimento drástico, a secagem ocorre sem que haja danos térmicos à estrutura e composição do produto (SCHUCK et al., 2009).

Na secagem por liofilização a perda de água ocorre por sublimação, em temperaturas negativas (-25°C) do leite congelado, devido à redução de pressão no ambiente onde ele se encontra. A liofilização apresenta a vantagem de não expor o leite humano às temperaturas elevadas, diminuindo assim o risco de inativação de enzimas e proteínas dele. A secagem por pulverização possui um custo de até 10 vezes menor que a secagem por liofilização (SCHUCK et al., 2013), o que aumenta a sua viabilidade.

Para que se obtenha um pó de qualidade e com segurança alimentar e que o processo seja passível de otimização deve-se definir os parâmetros operacionais e conhecer a composição físico-química, propriedades termodinâmicas, e as características microbiológicas do concentrado alimentado no secador (SCHUCK et al., 2009).

CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DO LHO E DE SEUS ÁCIDOS GRAXOS

1. INTRODUÇÃO

Os lipídios são os responsáveis pelo maior conteúdo energético do leite humano (LH), sendo então indispensáveis para o ganho de peso do lactente. Além do conteúdo energético, os lipídios do LH possuem os ácidos graxos necessários para o desenvolvimento completo do metabolismo dos bebês (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006).

Dentre os ácidos graxos presentes no leite estão os ácidos linoleico (C18:2n6) e linolênico (C18:3n3), denominados essenciais. Estes são precursores, respectivamente, dos ácidos araquidônico (ARA; C20:4n6) e decosa-hexanóico (DHA; C22:6n3), que fazem parte da síntese de membrana das células neurais e são importantes no desenvolvimento dos sistemas cognitivo e visual (HOFFMAN; BOETTCHER; DIERSEN-SCHADE, 2009).

O LH contém altos níveis de ácido palmítico (C16:0), que está relacionado à absorção de outros ácidos graxos e de cálcio. Auxilia assim na formação da estrutura óssea dos lactentes (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2001).

Essencialmente todos os tipos de alimentos estão sujeitos à oxidação de lipídios, principalmente os que possuem altos níveis de ácidos graxos insaturados. Esta oxidação é favorecida por tratamentos térmicos (VIEIRA; ZHANG; DECKER, 2017).

A oxidação dos lipídios pode causar ao alimento aromas desagradáveis e alterações de cor e de seu conteúdo nutricional.

Observando-se a importância dos ácidos graxos do LH, é necessário avaliar o comportamento dos mesmos durante o seu armazenamento para conhecer a composição dos lipídios entregues aos lactentes durante sua alimentação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a composição nutricional e de ácidos graxos do leite humano fornecido pelo banco de leite humano local e avaliar as alterações em sua composição causadas pelo processamento.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar os nutrientes presentes no LHO.
- Caracterizar as proteínas do LHO.
- Caracterizar os ácidos graxos presentes no LHO.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras de leite humano

Todo leite doado aos BLHs passa por análises sensoriais e físico-químicas conforme normas técnicas do Manual de Normas Técnicas para BLH (FIOCRUZ, 2019), previamente ao tratamento térmico de pasteurização. As análises sensoriais são seletivas e avaliam a conformidade da embalagem (frasco) do leite doado, o flavor, a cor e a presença de sujidades. As análises físico-químicas são as de acidez Dornic ($\leq 8^\circ\text{D}$), que classificam as alterações nos teores de ácidos láctico que podem dar indicações da qualidade microbiológica e Crematócrito, que trazem informações sobre o valor calórico do leite. O leite que apresentar não conformidades em quaisquer dos testes realizados é descartado.

As amostras de leite humano ordenhado (LHO) utilizadas na presente pesquisa foram doadas pelo BLH de Viçosa, MG; e corresponderam ao leite que seria até então descartado pela presença de sujidade encontrada nas análises de rotina.

No BLH, o leite doado foi misturado, formando um pool, ou leite de mistura, até o volume total do frasco de coleta (350 mL). Durante a coleta, foram também anotados dados do controle de qualidade das amostras como acidez Dornic, presença de sujidades, cor e cheiro característicos.

Foram coletados 18 frascos de pool de leite humano congelado a -18°C em diferentes datas, durante seis meses.

O LHO utilizado nas análises foi de diferentes doadoras da fase de lactação maduro (15º dia em diante após o parto). Assim, foi obtido leite de diversas doadoras, o que possibilitou determinar a composição média do leite obtido na região.

O pool de leite humano maduro será doravante denominado de LHO. Os frascos foram transportados do BLH ao Laboratório de Operações e Processos da Universidade Federal de Viçosa (LOP/UFV), em caixas térmicas com gelo reciclável, para a manutenção da temperatura e integridade da amostra; foram identificados e descongelados em banho termostatizado à

temperatura de 42°C. O leite de cada frasco foi filtrado em filtro de tecido esterilizado por autoclavagem com porosidade de 45 µm, para remoção das sujidades, sendo o teor de lipídios avaliado antes e após a filtração para observar possíveis perdas. Foi então separado em três partes. A primeira parte foi classificada como leite humano ordenhado cru (LHOc). O LHOc foi utilizado como parâmetro de controle. A segunda parte foi pasteurizada, gerando o leite humano ordenhado pasteurizado (LHO_p) e a terceira parte foi homogeneizada e depois pasteurizada formando o leite humano ordenhado homogeneizado-pasteurizado (LHO_{hp}). Os frascos foram separados por tipo de processamento do leite, análise a realizar e data da coleta. Uma alíquota de 2 mL de cada frasco foi separada em tubos Eppendorf (Eppendorf, Alemanha) para análise e acondicionada em freezer (General Eletric, Brasil) a -18°C.

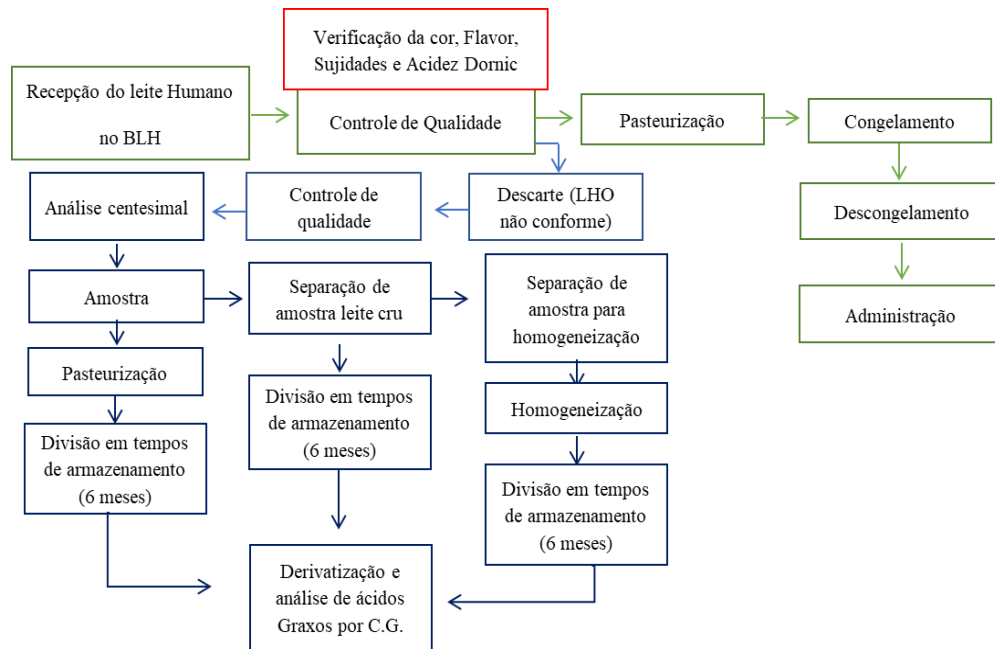
Foram realizadas as análises físico químicas de acidez Dornic, extrato seco por gravimetria e teor de lipídios Bligh & Dyer (1959) (BLIGH; DYER, 1959), com a finalidade de averiguar a qualidade do LHO.

Os volumes de LHO utilizados em toda a pesquisa foram, de 90 mL na caracterização dos ácidos graxos, de 60 mL na caracterização centesimal, para cada repetição. O restante do leite humano coletado foi reservado para utilização no desenvolvimento da metodologia de beneficiamento para obtenção de leite humano em pó alimentar.

Os reagentes usados nas análises foram hexano (grau HPLC, Sigma Aldrich, USA), clorofórmio (grau HPLC, VETEC Química Fina, Brasil), álcool metílico (grau HPLC, VETEC Química Fina, Brasil), sulfato de sódio anidro P.A. (VETEC Química Fina, Brasil) e cloreto de sódio P.A. (VETEC Química Fina, Brasil).

O Fluxograma 1 apresenta as etapas às quais o LHO foi submetido no BLH e aquelas realizadas para condução dos experimentos no presente trabalho. As análises realizadas estão descritas nas metodologias seguintes ao fluxograma.

Fluxograma 1 – Procedimentos realizados no BLH e os adotados na análise do LH



3.2. Delineamento experimental e análise estatística

As análises de composição dos ácidos graxos foram realizadas seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo realizadas em 18 tratamentos (cada coleta como um tratamento), com três repetições.

As análises centesimais foram realizadas a partir de um delineamento inteiramente casualizado sendo realizado três pools, cada um com seis alíquotas do leite coletado no BLH (repetições). Cada pool foi dividido em três tratamentos, sendo estes: leite humano cru (LHC), leite humano pasteurizado (LHP) e leite humano homogeneizado pasteurizado (LHHP).

A análise estatística foi realizada usando a ANOVA ($p \leq 0,05$) para verificar diferenças e o teste de Tukey, como teste de média, para verificar as diferenças entre as médias.

O software R versão 3.3.3 foi utilizado para análise de dados obtidos.

3.3. Pasteurização

O tratamento térmico visa a inativação dos microrganismos presentes no alimento pela ruptura da membrana celular, ácidos nucleicos e ribossomos. É um método de vasto uso para a conservação de alimentos (KHAN et al., 2018), mesmo que possa acarretar alterações sensoriais e nutricionais no alimento.

A pasteurização do leite humano foi realizada em banho-maria com a manutenção do leite a 62,5°C por 30 min (pasteurização lenta), para eliminar microrganismos patogênicos presentes no mesmo, sendo a mesma realizada em banho termostatizado (FIOCRUZ, 2011).

3.4. Homogeneização

A homogeneização é uma técnica comumente utilizada na indústria láctea para melhoria tecnológica em diversos produtos (SFAKIANAKIS; TOPAKAS; TZIA, 2015). É aplicada com a finalidade de evitar a separação de fases do leite (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2005), sendo utilizada então justamente para evitar a perda de LHO por adesão as paredes dos frascos e da sonda na alimentação dos neonatos.

O leite humano cru a 40°C foi homogeneizado por sonicação (sonicador ultrassônico VCX750, Church Hill RD. Newtown, EUA) utilizando uma sonda de 13 mm, frequência de 20 kHz, intensidade de 75% por 30 s.

O leite humano homogeneizado-pasteurizado (HPMH) foi obtido através da homogeneização do leite cru, seguida da pasteurização.

3.5. Determinação da composição centesimal do LHO

Primeiramente, o LHO foi avaliado em sua composição centesimal. Para a caracterização centesimal foram utilizados 60 mL de leite por repetição, em triplicata com 3 repetições cada. Foram determinadas a composição do leite relativas ao teor de umidade, proteínas totais, lipídios totais, açúcares totais, lactose e resíduo mineral fixo.

3.5.1. Umidade

A análise de umidade foi realizada pelo método gravimétrico, que consiste na retirada de água da amostra por evaporação em estufa. O teor de umidade foi calculado seguindo a equação (1):

$$Umidade (\%, m/m) = \frac{(PA - PAs)}{PA} * 100 \quad (1)$$

em que PA é a massa da amostra antes da secagem (umidade); e PAs é a massa do material seco (unidade), até peso constante.

Metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz - IAL (2008).

3.5.2. Proteínas brutas pelo método adaptado de micro Kjeldahl

O método adaptado de micro Kjeldahl (IAL, 2008) permite obter a porcentagem de proteína bruta a partir da concentração de nitrogênio da amostra. As etapas foram hidrólise ácida da amostra, destilação, captura do nitrogênio em ácido bórico, concentração do nitrogênio em forma de amônia e titulação de nitrogênio com solução padronizada de HCl.

O teor de nitrogênio (V_0 , m/m) foi obtido pela equação (2):

$$N (\%, m/m) = (V * N * f) * 14 * \left(\frac{1}{p}\right) * \left(\frac{1}{10}\right) \quad (2)$$

em que N é o teor de nitrogênio presente na amostra (% m/m); V é o volume de HCl (mL) gasto na titulação; N é a normalidade do HCl utilizado na titulação; f é o fator de correção da solução padronizada de HCl; e P é a massa da amostra (m).

O teor de proteínas (% m/m) foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio (% m/m) pelo fator de conversão 6,38 (valor utilizado para leite), calculado a partir da quantidade média de nitrogênio contido no LHO (IAL, 2008).

3.5.3. Proteínas por cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia para identificação de proteínas foi realizada em Cromatógrafo de Íons (Metrohm, 850 Professional IC, Suíça). Os tratamentos previamente diluídos (1g em 50ml de água mili Q), microfiltrada e os componentes foram separados por coluna SUPERDEX 75, a qual por diferença de tamanho dos componentes proteicos presentes na amostra, assim como a interação da amostra com o eluente, ocorre a separação dos constituintes, os quais são lidos em um detector UV (280 nm) ao final da linha do aparelho, sendo a leitura transmitida para o software (Metrohm, MagIC Net tm, Suíça) que acompanha o aparelho. Ao se comparar a leitura da amostra com a leitura de padrões previamente lidos em sete concentrações de 0 a 50 ppm, pode-se por equação de regressão linear se obter a concentração de proteínas da amostra (EITH et al., 2006).

3.5.4. Análise de eletroforese

A análise de eletroforese foi realizada para fracionamento e identificação das proteínas presentes no leite humano, sendo utilizado para esta análise o gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS - PAGE) de acordo com o descrito por Ouimet et al. (2016). As proteínas foram identificadas a partir da massa molecular da amostra, comparada a do padrão TrueColor (Sinapse Biotecnologia, Brasil).

3.5.5. Lipídios – método crematócrito

O método crematócrito é utilizado pelo BLH para quantificar os lipídios presentes no leite humano. Em tubos capilares de vidro foram adicionados 75 µL de leite humano e o sistema foi centrifugado (Eppendorf, Alemanha) a 12.000 rpm por 15 min. O creme separou-se do leite, as alturas do sistema e das fases separadas no tubo foram medidas, com paquímetro digital (LUCAS et al., 1978). A equação (3) foi usada para determinar o teor de creme do leite.

$$\text{Teor de creme } \left(\%, \frac{m}{v} \right) = \frac{(\text{Coluna de Creme (mm)}) \times 100}{\text{Coluna total de produto (mm)}} \quad (3)$$

A porcentagem de lipídios foi obtida pela equação (4):

$$\text{Teor de Lipídios } (\%, m/v) = \frac{\text{Teor de creme } (\%) \times 0,59}{1,46} \quad (4)$$

O valor energético do LHO foi obtido pela equação (5).

$$\text{Energia } \left(\frac{\text{Kcal}}{\text{Litro}} \right) = 66,8 + \text{Teor de Creme } (\%) + 290 \quad (5)$$

3.5.6. Lactose por cromatografia de íons

A cromatografia de íons foi realizada em cromatógrafo de íons (Metrohm, 850 Professional IC, Suíça). A amostra de LHO previamente diluída em água microfiltrada e

dializada (1 g em 50 mL) (Milli Q, Millipore, EUA, resistividade 18 MΩ*cm a 25°C) foi injetada em uma coluna de troca iônica (Metrohm CARB 2). A separação dos constituintes do leite ocorre devido a interações entre a fase móvel (Hidróxido de sódio 200 ppm) com os íons presentes na amostra, e entre a amostra com o eluente. Um detector ao final da linha do aparelho faz a leitura dos íons detectados, que é transmitida para o software (Metrohm, MagIC Net tm, Suíça). Ao se comparar a leitura da amostra com a leitura de padrões de lactose previamente lidos em sete concentrações de 0 a 50 ppm, obtém-se, por equação de regressão linear, a concentração de lactose da amostra (EITH et al., 2006).

3.5.7. Açúcares totais

A determinação dos açúcares totais foi dada por diferença nos outros constituintes das amostras a partir da equação (6).

$$\text{Açúcares totais } \left(\%, \frac{m}{m} \right) = 100 - \text{Proteínas totais} - \text{Lipídios totais} - \text{RMF} - \text{umidade} \quad (6)$$

3.5.8. Resíduo mineral fixo (RMF) – método de incineração em mufla

A análise de resíduo mineral fixo pelo método de incineração em forno tipo mufla, consiste em uma completa incineração da matéria orgânica, restando assim apenas os minerais (IAL, 2008). Após este procedimento o teor de resíduo mineral fixo foi calculado pela equação (7).

$$\text{RMF } (\%, m/v) = \frac{Pc - P\text{cadinho}}{PA} \times 100 \quad (7)$$

em que RMF é o resíduo mineral fixo (% m/v); PC é a massa do cadinho contendo as cinzas (g); P cadinho é a massa do cadinho (g); e PA é a massa da amostra (g).

3.5.9. Composição mineral

A quantificação dos minerais presentes no leite humano foi realizada por análise com espectrômetro de emissão ótica com plasma induzido (ICP OES) de acordo com Morgano et

al. (2005). A análise de espectrometria por emissão ótica com plasma induzido é uma técnica que utiliza a excitação de átomos a partir de plasma de argônio, os quais emitem uma radiação características dos elementos presentes na amostra em um comprimento de onda variando de 125 a 900 nm, os quais após separados pelo sistema ótico são identificados por detectores de radiação específicos.

3.5.10. Acidez expressa em ácido láctico

A análise de acidez foi realizada por titulação de 1 mL de LHO com solução padronizada de hidróxido de sódio e indicador fenolftaleína. O volume gasto de NaOH para neutralizar o teor de ácido presente no LHO, fornece a quantidade de ácidos presente no LHO sendo os mesmos expressos em teor de ácido láctico (% , V/V) (IAL, 2008).

3.6. Caracterização dos ácidos graxos

3.6.1. Amostra

A caracterização dos ácidos graxos foi realizada em 18 tratamentos em triplicata. As amostras foram coletadas no banco de leite humano do Hospital São Sebastião da cidade de Viçosa, MG, sendo utilizadas amostras que seriam descartadas pelo BLH por se encontrarem em não conformidade pela presença de sujidades físicas.

As amostras foram então transportadas do BLH ao Laboratório de Operações e Processos da Universidade Federal de Viçosa (LOP/UFV), em caixa térmica com gelo para a manutenção da temperatura e integridade da amostra. Já no LOP foram identificadas, filtradas em filtro de tecido esterilizado por autoclavagem com porosidade de 45 µm, para remoção das sujidades, pasteurizadas em banho termostático (Tecnal, Brasil) a uma temperatura de 62°C/30 minutos, separada uma alíquota de 2 mL em tubos Eppendorf (Eppendorf, Alemanha) para análise e acondicionadas em freezer (General Electric, Brasil) a -18°C.

3.6.2. Extração dos lipídios

Na metodologia de extração de lipídios adaptada de Bligh e Dyer (1959), o leite foi descongelado até 40°C em banho termostático (Tecnal, TE 184, Brasil) e uma alíquota de 0,5 g foi pesada em balança analítica (Shimadzu, AY 220, Japão). Ao sistema foi adicionado de 3

mL de uma mistura de 2:1 metanol:clorofórmio, para a extração dos lipídios. A mistura foi mantida sob agitação manual por 30 min, seguida da adição de 1 mL de clorofórmio e de 1,8 mL de solução salina (0,9 g/mL de NaCl). Após a separação das três fases formadas, a parte inferior (~ 2 mL) foi pipetada e levada à secagem (45°C) em banho seco (Labnet, D 1200, EUA). Após a secagem, a massa de lipídios presentes nas amostras foi determinada por gravimetria, obtendo-se uma média de 17,5 mg de lipídios. As fases superior e intermediária foram descartadas em frascos apropriados.

3.6.3. Derivatização

A amostra para a caracterização de ácidos graxos foi preparada pelo método de transesterificação direta que foi adaptado da metodologia descrita por Martinez et al. (2012), na qual foi adicionada em um frasco de derivatização 100 microlitros de um padrão de C11 como padrão interno, em solução de 10 mg/ml em hexano, então evaporado o hexano e posteriormente adicionado 15 mg de óleo, adicionou-se 1 ml de solução de KOH 1M em etanol 70%, manter os frascos em banho seco por uma hora para saponificação a uma rotação de 200 rpm em mesa agitadora (Marconi, MA 140/CF). Posteriormente, adicionar 300 µl de HCl 8M. Adicionou-se 2 ml de hexano e 1 ml de solução de NaCl a 0,9% (m/v), levar a aparelho de vortex e posteriormente deixar sob repouso para separação de fases. Pipetar 1 ml do sobrenadante para outro frasco e realizar lavagem da amostra com 1 ml de hexano por cinco vezes. A amostra foi seca em estufa a 65°C para remoção do hexano. Sendo adicionado 2 ml de H₂SO₄ 2% (v/v) em metanol e levar em banho seco a 90°C por 90 minutos. Após este procedimento, adicionou-se 1 ml de solução de NaCl 0,9% (m/v) e 2 ml de hexano. Coletou-se 1 ml do sobrenadante e o transfere para um ependorf contendo 0,1 g de sulfato de sódio anidro. Procede-se agitação em vortex (Phoenix Lufenco, Brasil) por um minuto, posteriormente uma centrifugação a 2800 RCF por 15 minutos (Eppendorf, Alemanha) e coleta-se 500 microlitros do sobrenadante ao qual foi adicionado 500 microlitros de hexano em frasco vial apropriado e posteriormente levado ao Cromatógrafo Gasoso (Shimadzu, GC-2010, Japão) usando uma coluna capilar de 100 m x 0,25 mm (SP-2560, Sigma Aldrich, EUA), para que seja realizada a caracterização dos ácidos graxos.

Os ácidos graxos foram identificados por meio dos tempos de retenção dos FAMES da amostra comparados aos tempos de retenção da mistura padrão FAME (Supelco, 37 componentes FAMES Mix, Sigma Aldrich, EUA). Três repetições foram realizadas para a análise de cada amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição centesimal

Os componentes nutricionais do leite humano o qualificam como o melhor alimento para o bebê pois, além do ganho de peso e do desenvolvimento, proporcionam proteção ao organismo infantil e atuam na prevenção de doenças (WALKER, 2010) como displasia broncopulmonar, enterocolites necrosante, retinopatia severa, dentre outros (GIANNI; ROGGERO; MOSCA, 2019).

Diversos fatores como período de lactação, genética e alimentação podem alterar a composição/proporção dos componentes nutricionais do leite humano (QIAN et al., 2010), entretanto não existem muitas informações sobre alterações causadas pelo processamento do leite humano, tornando necessária a obtenção destas informações.

Dentre os nutricionais são identificados lipídios, proteínas, açúcares e resíduo mineral fixo. Cada um destes nutrientes é constituído por diferentes compostos como ácidos graxos para os lipídios; enzimas, imunoglobulinas, aminoácidos e proteínas específicas para as proteínas; lactose e oligossacarídeos para os açúcares; e diversos minerais como cálcio, potássio, ferro etc. para o resíduo mineral fixo, que exercem funções específicas no desenvolvimento do neonato.

As análises físico-químicas demonstraram a qualidade do LHO avaliado no presente trabalho. A acidez média encontrada foi de 6°D, sendo que nenhuma das amostras utilizadas ultrapassou o valor de 8°D (padrão exigido pela RBBLH). O teor total médio de lipídios encontrado no leite avaliado foi de 3,29%, e o teor de extrato seco médio foi de 11%.

A Tabela 3 mostra a composição nutricional dos três tipos de leite de mistura, não conforme pela presença de sujidades físicas, avaliados no presente trabalho. São eles, leite humano cru (LHC), leite humano pasteurizado (LHP) e leite humano homogeneizado-pasteurizado (LHHP).

Devido à análise de lipídios antes e após a filtração pode-se observar uma perda média de $0,5\% \pm 0,13$ do teor total de lipídios presentes no leite humano após a filtração.

Não foi verificada diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os resultados dos conteúdos dos componentes nutricionais do leite humano após o processamento de pasteurização e homogeneização seguida de pasteurização.

A ausência de diferença significativa entre os tratamentos demonstra uma manutenção nos teores de nutrientes do leite humano ordenhado, mesmo após sofrer os processamentos de pasteurização e homogeneização seguida de pasteurização.

Tabela 3 – Composição nutricional do leite humano não conforme, leite humano cru (LHC), leite humano pasteurizado (LHP) e leite humano homogeneizado-pasteurizado (LHHP)

Compostos	LHC ± sd	LHP ± sd	LHHP ± sd
Umidade *	88,35 ± 0,157	88,37 ± 0,163	88,27 ± 0,169
Lipídios *	3,3 ± 0,042	3,29 ± 0,039	3,27 ± 0,045
Proteínas *	1,1 ± 0,068	1,093 ± 0,076	1,098 ± 0,074
Lactose *	6,42 ± 0,18	6,41 ± 0,14	6,55 ± 0,25
Cinzas *	0,26 ± 0,022	0,25 ± 0,015	0,24 ± 0,018
Na **	20,35 ± 1,98	20,31 ± 2,01	20,29 ± 2,17
Mg **	2,17 ± 0,19	2,15 ± 0,12	2,14 ± 0,17
P **	9,2 ± 0,88	9,19 ± 0,97	9,16 ± 0,93
K **	34,91 ± 2,84	33,54 ± 2,61	32,99 ± 2,59
Ca **	20,23 ± 0,92	19,98 ± 0,52	19,82 ± 0,81
Fe **	0,027 ± 0,011	0,025 ± 0,014	0,022 ± 0,016
Zn **	0,501 ± 0,061	0,497 ± 0,056	0,486 ± 0,058

sd = Desvio Padrão; * g/100 mL; ** mg/100 mL.

O leite humano, não conforme pela presença de sujidades físicas, apresenta concentração de seus macronutrientes em conformidade com a literatura (CEDERLUND et al., 2013; DROR; ALLEN, 2018).

O conteúdo proteico do leite humano conceitua um importante fator no ganho de peso e crescimento do neonato, havendo um grande aumento em seus teores em caso de nascimento prematuro (BAUER; GERSS, 2011).

Observa-se na Figura 1 que as proteínas do leite humano analisado são, majoritariamente, compostas por caseína, lactoferrina, alfa-lactoalbumina, imunoglobulina-G (IgG) e imunoglobulina-A (IgA).

A Tabela 4 indica que o tipo de processamento não alterou significativamente ($p \geq 0,05$; teste de Tukey) as concentrações das proteínas do LHO, demonstrando que o processamento não afetou os teores de proteínas específicas do LHO e assim o mesmo se mantendo ótimo nutricionalmente para sua utilização.

Figura 1 – Composição proteica do LHO (cromatógrafo de íons, separação por exclusão molecular, coluna SUPERDEX 75 e 280 nm)

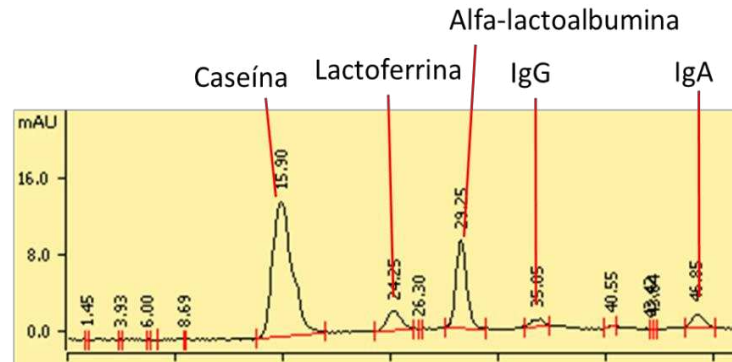


Tabela 4 – Concentrações das proteínas no LHO em cada tratamento

Proteínas	LHO \pm sd	LHP \pm sd	LHHP \pm sd
Caseína*	1,6 \pm 0,082	1,6 \pm 0,16	1,57 \pm 0,17
Lactoferrina*	2,5 \pm 0,24	2,5 \pm 0,26	2,5 \pm 0,16
Alfa-lactoalbumina*	2,98 \pm 0,26	2,98 \pm 0,22	2,98 \pm 0,21
IgG**	29,8 \pm 2,69	28,85 \pm 2,97	28,52 \pm 3,05
IgA**	146,97 \pm 3,07	145,13 \pm 2,83	143,77 \pm 2,81

Sd = Desvio Padrão; * mg/mL; ** μ g/mL.

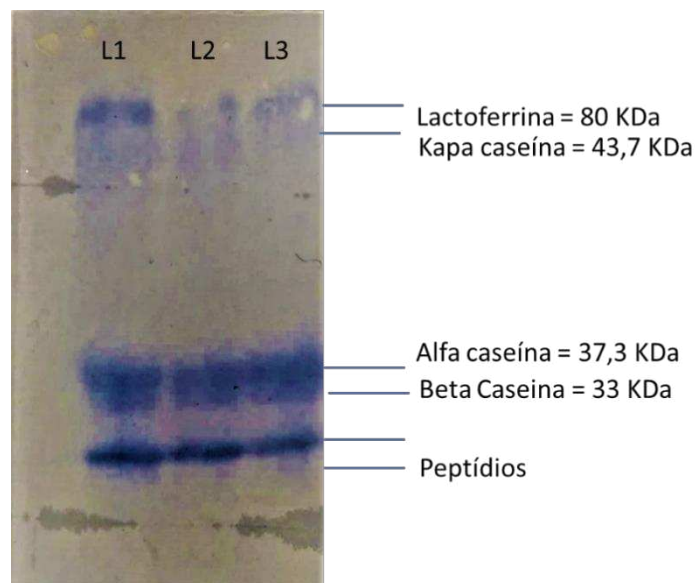
As proteínas presentes no leite humano são vulneráveis à desnaturação devido ao processamento térmico e mecânico (PERMANYER et al., 2010). Dentre as proteínas mais sensíveis ao processamento do leite humano estão as imunoglobulinas, como IgA e IgG (CASTRO-ALBARRÁN et al., 2016). Pelo motivo das imunoglobulinas serem oriundas da transferência de imunidade materna, existe uma grande preocupação com a perda destas proteínas, pois esta ocasionaria perda de imunidade para o neonato (PICAUD; BUFFIN, 2017).

Entretanto neste trabalho mesmo as proteínas sendo sensíveis a desnaturação por tratamentos térmicos e mecânicos, não foram observadas alterações significativas ($p \geq 0,05$) em suas concentrações durante os tratamentos, demonstrando então que os tratamentos empregados no LHO não causaram perdas nutricionais no conteúdo proteico do LHO.

A análise de eletroforese, apresentada na Figura 2, indicou a presença das mesmas proteínas detectadas por cromatografia por exclusão molecular com exceção das

imunoglobulinas. Observa-se também a presença de peptídios menores e a divisão da caseína. As intensidades da maior parte das bandas de eletroforese foram mais evidentes nos leites 2 (LHP) e 3 (LHHP), o que denota uma maior desnaturação das proteínas nos leites processados. Essa maior desnaturação também é evidenciada pelo fato de haver maior concentração de peptídios devido a bandas mais espessas nos leites processados.

Figura 2 – Perfis proteicos SDS PAGE (30% T e 2,7% C): gel de concentração de 4,5% e gel de separação de 14%. Pool de leite humano na fase maduro, com 20 µg



Canaleta 1: padrão de massa molecular; Canaleta 2: L3 (leite homogeneizado-pasteurizado); Canaleta 3: L2 (leite pasteurizado); e Canaleta 3: L1 (leite cru).

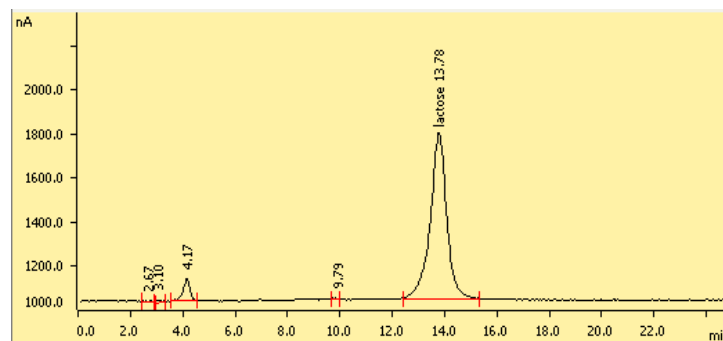
A lactoferrina tem função imunomoduladora e atividade antibacteriana e antiviral, alfa-lactoalbumina contém peptídios prebióticos e imunoestimulatórios, kappa-caseína apresenta atividade antibacteriana e as IgG e IgA representam a transferência de imunidade maternal (LÖNNERDAL, 2016).

Proteínas como as lactoferrina, alfa-caseína e beta-caseína apresentaram bandas mais espessas no leite cru indicando concentrações maiores neste tipo de leite. Proteínas como lactoferrina, alfa e beta caseína apresentaram bandas com maiores intensidade para os leites processados indicando maior desnaturação para esses tipos de leite.

A lactose é o carboidrato majoritário (6,41%) no leite humano (Tabela 3 e Figura 3), sendo a concentração média de lactose encontrada no leite humano (~7%) (VENEMA, 2012). A lactose presente no leite humano é uma fonte de energia metabolizada pelo intestino, atua na

homeostase intestinal, no desenvolvimento da microbiota intestinal, na resposta imune inata do neonato por meio da estimulação da expressão do gene do peptídeo antimicrobiano catalicidina e fornece ao organismo as proporções adequadas de galactose e glicose. A glicose provê energia para as reações aeróbicas e anaeróbicas e ATP a cada célula do corpo, enquanto que a galactose age no desenvolvimento do cérebro (CEDERLUND et al., 2013; VENEMA, 2012; ADAM; RUBIO-TEXEIRA; POLAINA, 2004).

Figura 3 – Cromatogramas obtidos por cromatografia de íons usando coluna Carb 2 para separação da mistura de padrões de açúcares, com fase móvel composta de hidróxido de sódio 200 ppm em água deionizada, 0,5mL/min



Observa-se na Tabela 3 que o conteúdo de minerais do LHO não sofreu alterações significativas ($p \geq 0,05$) devido ao processamento. De acordo com Li et al. (2016), as concentrações dos minerais presentes no leite humano são controlados por mecanismos de homeostase das células mamárias, são alteradas com as mudanças das fases de lactação e não se alteram com modificações na dieta materna. Estes autores também verificaram menores proporções de minerais em leites com maiores teores de lactose, provavelmente visando uma compensação do potencial osmótico do leite materno.

O consumo de proporções inadequadas de algum mineral pode levar a prejuízos no crescimento do neonato (WEI et al., 2020). Por exemplo, a redução na ingestão de cálcio, indispensável para a formação da massa óssea do neonato, pode provocar problemas ósseos (ABRAMS, 2006). A absorção de cálcio do leite humano se torna maior pela presença do ácido palmítico na posição Sn2 do triacilglicerol, pois durante a digestão o ácido palmítico auxilia na condução do cálcio facilitando sua absorção pelo organismo (INNIS, 2011).

A ingestão de ferro é necessária para a formação e composição da hemoglobina, evitando o acometimento por anemia (SWAMINATHAN et al., 2019), além do ferro ser essencial para o neurodesenvolvimento (BAKER et al., 2010).

Os lipídios do leite humano são responsáveis por grande parte do ganho de peso do lactente, e por aproximadamente 50% da energia fornecida pelo leite humano (GROTE et al., 2016). Os lipídios do leite humano são compostos por aproximadamente 98% de triacilgliceróis esterificados, 0,5% de colesterol, 0,8% de fosfolipídios além de outros lipídios (KIM; FRIEL, 2012).

Na composição dos lipídios do leite humano, encontram-se ácidos graxos imprescindíveis para o desenvolvimento do recém-nascido, como os ácidos docosahexaenóico (DHA), aracdônico (ARA) e eicosapentanoico (EPA) que fazem parte do desenvolvimento do sistema visual e cognitivo do bebê (INNIS, 2014). Assim como também estão presentes seus precursores, os ácidos graxos essenciais ácido linoleico (AL) e ácidos alfa linolênico (ALA) (DEMMELMAIR; KOLETZKO, 2018).

Verificou-se então que os tratamentos empregados no LHO neste trabalho não ocasionaram em perdas nutricionais, mantendo o mesmo como uma ótima fonte destes nutrientes específicos tão necessários para a nutrição dos neonatos.

4.2. Perfil de ácidos graxos do leite humano ordenhado

A literatura relata que a composição de ácidos graxos do leite humano varia de acordo com a alimentação materna, assim como com os diferentes estágios de lactação (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006; DELPLANQUE et al., 2015; GEORGE et al., 2018). Foram observadas diferenças significativas, a 5% de significância, na composição dos ácidos graxos dos leites analisados. Essas diferenças estão apresentadas na Tabela 5 e apontam para uma não uniformidade nos teores de AG, possivelmente originada pela variedade e rotatividade de doadoras no BLH, além do fato da composição do leite humano poder sofrer alterações entre períodos, no decorrer do dia e em uma mesma mamada.

Apesar da não uniformidade nas concentrações dos ácidos graxos, observa-se a manutenção nas distribuições de AG, entre os seus tipos mais abundantes. Verificou-se uma maior concentração de ácidos graxos na ordem decrescente de AG saturados, AG monoinsaturados e AG poli-insaturados.

Tabela 5 – Perfil lipídico do leite humano de 18 coletas e análise de diferenças entre a concentração de cada ácido graxo por coleta

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
C8:0	0,0371c	0,0398b	0,0258f	0,0155h	0,0248f	0,0186g	0,0328d	0,0272e	0,02 g	0,0276e	0,0286e	0,0344d	0,0240f	0,0288e	0,03,25d	0,0333d	0,0296e	0,0456a
C10:0	1,59 i	1,80 h	1,91 g	2,08 e	2,46 d	2,44 d	2,44 d	2,12 e	1,84 h	2,88 b	3,16 a	1,93 f	2,50 d	1,86 g	1,82 h	2,05 e	2,75 c	2,49 d
C12:0	7,24 d	8,92 b	8,25 b	8,66 b	7,83 c	8,70 b	8,56 b	8,57 b	7,23 d	8,85 b	10,22 a	7,45 d	7,45 d	6,68 e	7,19 d	7,36 d	6,60 e	6,44 e
C14:0	6,22 j	7,89 e	7,64 f	8,19 d	6,61 i	9,34 b	7,73 f	8,92 c	7,30 g	8,34 d	9,94 a	6,85 h	6,91 h	7,73 f	7,84 e	7,65 f	9,83 a	9,18 b
C14:1	0,0148g	0,0157g	0,0206e	0,0172f	0,0269c	0,0193f	0,0214e	0,0236d	0,0217e	0,0227d	0,0155g	0,0184f	0,0206e	0,0225d	0,0222d	0,0364b	0,0414a	0,0365b
C15:0	0,0156e	0,0165e	0,0159e	0,0176d	0,0216b	0,0190c	0,0189c	0,0188c	0,0212b	0,0234a	0,0179d	0,0205b	0,0194c	0,0196c	0,0222a	0,0237a	0,0177d	0,0198c
C16:0	22,28 b	21,86 c	21,29 d	21,38 d	21,85 c	21,85 c	21,76 c	20,82 e	21,59 c	22,42 b	21,35 d	22,89 a	20,28 f	22,59 b	21,47 d	21,71 c	21,42 d	21,62 c
C16:1	2,38 b	2,86 a	2,31 b	2,29 b	3,15 a	2,03 c	2,71 a	2,38 b	2,55 b	2,28 b	2,27 b	2,39 b	2,86 a	1,35 d	1,88 c	1,46 d	1,18 d	1,79 c
C17:0	0,0138j	0,0173i	0,0176i	0,0191g	0,0205f	0,0227d	0,0218e	0,0194g	0,0219e	0,0249a	0,0183h	0,0253a	0,0224d	0,0221e	0,0212f	0,0208f	0,0240b	0,0232c
C17:1	0,0117f	0,0117f	0,0116f	0,0132e	0,0157d	0,0133e	0,0141e	0,0139e	0,0148d	0,0131e	0,0102g	0,0173c	0,0159d	0,0178c	0,0119f	0,0337a	0,0156d	0,0198b
C18:0	5,72 b	5,99 b	5,96 b	5,87 b	5,67 b	6,06 b	5,66 b	5,56 b	5,82 b	6,56 a	5,58 b	6,66 a	5,44 b	6,80 a	6,42 a	6,55 a	6,10 b	5,14 b
C18:1n9t	0,03 d	0,0524a	0,0428b	0,0327d	0,0413c	0,0501*	0,0502a	0,0483a	0,0384c	0,0324d	0,0377c	0,0438b	0,0514*	0,0477a	0,0494a	0,0457b	0,0338d	0,0514a
C18:1n9c	30,98 a	29,55 f	28,64 i	27,66 l	29,69 e	27,66 l	27,79 k	28,06 j	29,30 g	26,16 m	24,24 n	30,66 b	30,71 b	30,23 c	30,94 a	29,88 d	29,09 h	28,06 j
C18:2n6c	18,63 c	17,10 f	18,64 c	18,69 c	17,38 e	15,88 i	17,49 e	18,88 b	18,86 b	14,90 k	16,94 g	15,56 j	19,56 a	17,78 d	17,43 e	18,75 c	16,67 h	18,94 b
C20:0	0,027 k	0,0304i	0,0289j	0,0322g	0,034 f	0,0322g	0,0371c	0,0365d	0,0327g	0,0363d	0,0335f	0,0332f	0,0355e	0,0124 l	0,0376c	0,0398b	0,0474a	0,0312h
C18:3n3	1,38 f	1,47 d	1,77 b	1,89 a	1,50 d	1,64 c	1,76 b	1,94 a	1,95 a	1,49 d	1,62 c	1,23 g	1,79 b	1,73 b	1,41 e	1,34 f	1,67 c	1,80 b
C20:2	0,0336d	0,0392c	0,0401c	0,0436b	0,0448b	0,0335d	0,0384c	0,0354d	0,0394c	0,0344d	0,0364d	0,0497a	0,0405c	0,0404c	0,0362d	0,0245e	0,0357d	0,0363d
C22:1n9	0,0515c	0,0385e	0,0478d	0,0465d	0,0527c	0,0295f	0,0388e	0,0425e	0,0495c	0,0556b	0,0397e	0,0452d	0,0566b	0,0265f	0,0257f	0,0643a	0,0366e	0,0437d
C22:0	0,0284i	0,0409e	0,0396f	0,0496c	0,0486c	0,0409e	0,0509b	0,0505b	0,0461d	0,0419e	0,0415e	0,0365g	0,0326h	0,0633a	0,062 a	0,0254j	0,0296i	0,0259j
C20:4n6	0,422 e	0,425e	0,483d	0,610 a	0,585b	0,524c	0,616a	0,563b	0,601a	0,543c	0,537c	0,507d	0,586b	0,149g	0,552c	0,437e	0,443e	0,350 f
C22:6n3	0,76 d	1,00 c	0,63 e	0,87 c	0,89 c	0,55 e	0,33 f	0,15 g	0,72 d	2,27 a	1,56 b	0,80 c	0,89 c	0,90 c	0,89 c	0,66 e	0,71 d	0,80 c

Letras diferentes em cada linha informam as diferenças entre as concentrações de cada ácido graxo pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância, entre as diferentes coletas realizadas.

Em todas as amostras analisadas, observou-se uma maior concentração do ácido oleico (C18:1n9c), seguida pelo ácido palmítico (C16:0) e então pelo ácido linoleico (C18:2n6c).

Na presente pesquisa foram identificados e analisados 21 ácidos graxos no leite, dentre os quais oito se apresentam em maior concentração média, perfazendo 92,67% do total dos ácidos graxos do perfil lipídico (Tabela 5). São eles o ácido láurico (C12:0, 7,9%), ácido mirístico (C14:0, 8,01%), ácido palmítico (C16:0, 21,7%), ácido esteárico (C18:0, 5,98%), ácido oleico (C18:1n9c, 28,9%), ácido linoleico (C18:2n6c, 17,7%), ácido linolênico (C18:3n3, 1,63%) e ácido docosa-hexaenoico (DHA; C22:6n3, 0,85%).

Os ácidos graxos presentes no leite analisado são classificados em ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Os ácidos graxos saturados em maior concentração foram o C16:0, seguido de C12:0 e C14:0. O C14:0 apresentou concentrações maiores que o C12:0 nas coletas 6, 8, 9, 14, 15, 16, 17 e 18, compondo na média uma concentração um pouco maior de C14 que a do C12:0. Na coleta de número 14, o C18:0 apresentou maiores concentrações que o C12:0 (Tabela 5).

O ácido oleico (C18:1n9c), é o ácido graxo mais abundante no leite, mesmo que a variação estatística entre as coletas avaliadas tenha sido elevada (24,24 a 30,98%). A coleta 1 exibiu a maior concentração de ácido oleico (30,98%) e a coleta 11 a menor concentração (24,24%), sendo este o AG cuja variação estatística foi maior, com média de 28,9% entre as 18 coletas.

As coletas com concentrações de ácido oleico estatisticamente iguais ($p \geq 0,05$) foram as coletas 1 e 15; 12 e 13; 8 e 18; e 4 e 6, como mostra a Tabela 5.

Foram identificados também cinco ácidos graxos poli-insaturados: ácido linoleico (C18:2n6c – AL; 17,67%), ácido docosa-hexaenoico (DHA – C22:6n3; 0,85%), ácido linolênico (C18:3n3 – ALA; 1,63%), o ácido araquidônico (C20:4n6 – ARA; 0,496 %) e o ácido eicosadienóico (C20:2; 0,0379 %). O conteúdo de ácido linoleico, à semelhança de outros ácidos graxos, também exibiu variações entre as amostras. As coletas com teores de AL considerados iguais estatisticamente foram as 8, 9 e 18; 1, 3, 4 e 16; e 5, 7 e 15. As coletas 13 e 10 apresentaram a maior e a menor concentração de AL, respectivamente.

A maior concentração de ácido linolênico foi a da coleta 9 (1,95%), que é idêntica estatisticamente às coletas 4 e 8, enquanto a menor fração foi encontrada na coleta 12 (1,23%). A proporção média entre AL e ALA observada foi de 11:1.

O conteúdo de ácido docosaenoico em todas as amostras de leite foi elevado (média de $0,85 \pm 0,45$), situando-se inclusive acima de muitos dos valores encontrados na literatura para diversas regiões e países do mundo. As coletas 10 e 11 apresentaram as maiores

concentrações de DHA. Apesar da grande variabilidade de médias nas concentrações de DHA, as coletas iguais estatisticamente foram as 2, 4, 5, 12, 13, 14, 15 e 18; 1, 9 e 17; e 3, 6 e 16.

Os teores de ácido araquidônico mostraram grande variação nas médias. Na coleta 14 foi observada a menor concentração, nas coletas 4, 5, 7, 8, 9 e 13 as maiores concentrações de ARA e nas coletas 4, 7 e 9 não foram verificadas variabilidade estatística ($p \leq 5\%$).

Foram observadas poucas correlações significativas entre os ácidos graxos identificados no leite humano (Tabela 6).

O ácido linolênico apresentou correlação negativa e baixa (-0,30) com o DHA demonstrando que quanto maior o teor de DHA menor o teor de ácido linolênico, entretanto esta correlação não é significativa estatisticamente, o que pode vir a indicar que apenas uma pequena quantidade do teor de DHA presente no leite humano provém do seu precursor, podendo ser oriundas de outras fontes como possivelmente da dieta materna ou de suas reservas corpóreas.

Como observado na Tabela 6, o ácido decosahexaenóico não apresentou correlação forte com nenhum ácido graxo neste estudo, sendo as únicas correlações estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$ as encontradas com o ácido cáprico (0,46) e com o ácido linoleico (-0,5).

A correlação positiva moderada entre o ácido cáprico e o DHA, demonstra o aumento de um quando ocorre o aumento do outro. Já a correlação negativa moderada entre o DHA e o ácido linoleico, demonstra que quando ocorre o aumento de um ocorre a redução dos teores do outro.

O ácido linoleico apresentou correlação negativa não significativa e muito baixa (-0,03) com o ARA o que pode demonstrar que apesar de haver uma pequena diminuição do ácido linoleico quando ocorre um aumento do ácido araquidônico, a maior parte do ARA encontrado no leite humano parece provir de outras fontes (como dieta e reservas corpóreas) que não o seu precursor. Tendo o ácido linoleico apresentado correlação estatisticamente significativa apenas com o ácido esteárico (-0,52) e ácido palmítico (-0,61), sendo ambas correlações negativas.

Tabela 6 – Correlação de Pearson entre os ácidos graxos do leite humano analisado

	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1n9t	C18:1n9c	C18:2n6c	C20:0	C18:3n3	C20:2	C22:1n9	C22:0	C20:4n6	C22:6n3	
C8:0	1																					
C10:0	-0,13	1																				
C12:0	-0,3	0,38	1																			
C14:0	-0,04	0,62**	0,3	1																		
C14:1	0,26	0,27	-0,58*	0,32	1																	
C15:0	-0,05	0,16	-0,21	-0,11	0,37	1																
C16:0	0,29	-0,23	-0,14	-0,25	-0,12	0,19	1															
C16:1	-0,16	-0,03	0,45*	-0,48*	-0,59**	-0,14	-0,17	1														
C17:0	-0,08	0,4	-0,3	0,23	0,45*	0,62**	0,18	-0,28	1													
C17:1	0,22	-0,08	-0,45	-0,11	0,64**	0,55*	0,09	-0,44	0,3	1												
C18:0	-0,06	-0,27	-0,15	-0,15	0,01	0,41	0,62**	-0,45	0,32	0,27	1											
C18:1n9t	0,29	-0,14	-0,09	0,03	0,06	0,12	-0,22	0,08	0,19	0,21	-0,1	1										
C18:1n9c	0,21	-0,73**	-0,73**	-0,71**	0,09	0,07	0,12	-0,02	-0,04	0,28	0,26	0,23	1									
C18:2n6c	-0,01	-0,37	-0,31	-0,25	0,1	-0,22	-0,61**	0,07	-0,45	0,23	-0,52*	0,17	0,3	1								
C20:0	-0,03	0,43	0,08	0,3	0,46*	0,25	-0,4	-0,01	0,28	0,14	-0,16	-0,12	-0,15	-0,15	1							
C18:3n3	-0,44	0,14	0,05	0,33	0,04	-0,27	-0,58**	0,05	0	-0,23	-0,53*	0,09	-0,32	0,51*	-0,1	1						
C20:2	-0,19	-0,12	0	-0,34	-0,38	-0,19	0,16	0,48*	0,16	-0,41	-0,03	0	0,17	-0,13	-0,27	0,09	1					
C22:1n9	-0,04	0,06	0	-0,42	0,14	0,25	-0,14	0,32	-0,09	0,44	-0,17	-0,33	0,04	0,29	0,26	-0,12	-0,14	1				
C22:0	-0,36	-0,19	0,18	-0,05	-0,38	0,13	0,08	0,11	0,02	-0,39	0,27	0,17	-0,02	-0,11	-0,36	0,23	0,33	-0,58*	1			
C20:4n6	-0,48*	0,25	0,47*	-0,07	-0,25	0,13	-0,43	0,61**	0,02	-0,3	-0,34	-0,15	-0,25	-0,03	0,61**	0,15	0,16	0,3	0,06	1		
C22:6n3	0,01	0,46*	0,32	0,11	-0,16	0,29	0,28	0,03	0,17	-0,19	0,26	-0,42	-0,42	-0,50*	-0,04	-0,3	-0,01	0,18	-0,02	-0,02	1	

Significância da correlação Pearson entre ácidos graxos do leite humano * p-valor $\leq 0,05$. ** p-valor $\leq 0,01$.

O ácido palmítico apresentou correlação positiva moderada com o ácido esteárico (0,62) e baixa com o ácido heptadecanóico (0,18), ácido oleico (0,12), ácido eicosadienóico (0,16) e DHA (0,28) além de demonstrar correlação negativa moderada com o ácido linoleico (-0,61) e ácido linolênico (-0,58), uma correlação negativa fraca com os ácidos araquídico (-0,40), araquidônico (-0,43), palmitoleico (-0,17), elaídico (-0,22) e erúcico (-0,14), como visto na Tabela 6. Estes dados demonstram que os teores de ácido palmítico no leite humano estão correlacionados medianamente com os teores do ácido esteárico, indicando um aumento do teor de ácido palmítico correlacionado a um aumento do teor do ácido esteárico.

Foi observada também uma correlação negativa entre as concentrações de ácido palmítico e os teores dos ácidos linoleico, linolênico, indicando uma redução das concentrações destes ácidos graxos com o aumento dos teores de ácido palmítico. Sendo que apenas as correlações encontradas do ácido palmítico com os ácidos esteárico, linoleico e linolênico são estatisticamente significativas.

Os lipídios presentes no leite humano contêm uma variedade de componentes indispensáveis para o bom desenvolvimento e funcionamento do organismo, como os ácidos graxos monoinsaturados, saturados, poli-insaturados (PUFAs), além de vitaminas lipossolúveis (DELPLANQUE et al., 2015).

Muitos estudos da literatura, nos quais os AG do leite humano são avaliados, descrevem diferenças nos perfis lipídicos, associadas à diferentes regiões e à alimentação da nutriz (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006; NISHIMURA et al., 2013; BARREIRO et al., 2018). A dieta é a principal responsável pela variabilidade dos AG (DEMMELMAIR; KOLETZKO, 2018).

Em países como México e Chile, nos quais uma elevada quantidade de milho é consumida, o leite humano pode conter uma alta proporção de ácido linoleico; enquanto que em países nos quais as dietas se baseiam em alimentos pobres em ácidos graxos essenciais, em gorduras totais e com altos teores de carboidratos, como nas Philipinas e na Nigéria, o leite humano possui menores concentrações de ácido linoleico e ácido linolênico bem como maiores teores de ácido mirístico e ácido láurico, quando comparados com os valores das médias desses AG em outros países (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006; KIM; FRIEL, 2012).

Na literatura são encontrados estudos do perfil lipídico do LH, tanto de indivíduos quanto de grupos de indivíduos (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006; NISHIMURA et al., 2013; ANDREAS; KAMPMANN; LE-DOARE, 2016; BARREIRO et al., 2018). O presente estudo difere daqueles encontrados na literatura pelo tipo de matriz empregada, ou seja, o pool de leite humano não conforme, somente pela presença de sujidades físicas, de um BLH. Não tendo

havido alterações de acidez pode-se tratar o LHO como um no qual não houve alterações microbiológicas causadas por fermentação, sendo a carga microbiológica reduzida com a pasteurização antes de sua utilização, seguindo os formatos que ocorrem no BLH.

Devido à importância relaciona aos lipídios presentes no LH no desenvolvimento do neonato, assim como suas características específicas voltadas para estes, vimos neste LHO que seria descartado, a possibilidade de utilização assim como de seus lipídios, na formulação de leites homólogos para fortificação de formulações e alimentação dos neonatos. Evitando com o reaproveitamento do LHO que seria descartado por sujidades, que este alimento seja desperdiçado. Assim, informações acerca da composição de AG do pool de leite humano utilizada pelo BLH dessa microrregião da Zona da Mata mineira foram obtidas.

De acordo com dados encontrados na literatura a alimentação predominante na região onde o estudo foi realizado se caracteriza pela maior proporção de carboidratos, com teores de lipídios e proteínas semelhantes, sendo os carboidratos mais consumidos o arroz; açúcar; pão; tubérculos; e macarrão, as proteínas mais consumidas oriundas de origem animal, principalmente bovina, além de um alto consumo de leite (LIMA et al., 1989; DE SALES et al., 2006). Estas características dietárias, corroboram com a abundância de ácido mirístico e esteárico, assim como os valores encontrados de ácidos graxos saturados, entretanto é necessário estudos mais recentes sobre o consumo alimentar da região para melhores elucidaciones sobre sua influência no leite materno.

4.2.1. Ácidos graxos saturados (AGS)

Dietas com altos teores de gordura, como produtos de origem animal e fast foods, podem aumentar o teor dos ácidos graxos saturados no leite humano. No organismo, cada ácido graxo saturado segue uma linha metabólica diferente, tendo variadas funções no seu desenvolvimento e funcionamento (RIOUX; LEGRAND, 2007).

Os ácidos graxos saturados presentes no LH encontram-se em uma concentração média de 45,8% no perfil lipídico, como visto na Tabela 7. Tal valor médio é próximo do reportado na literatura para a Austrália, o Reino Unido, Japão e Brasil, abaixo das Philipinas e acima da média de outros países.

Tabela 7 – Médias da composição de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, comparadas aos dados para regiões de 12 países

Presente estudo	Taiwan (WU et al., 2010)	Espanha (BARREIRO et al., 2018)	Austrália (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006)	Canadá (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006)	Chile (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006)	China R. (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006)	Reino Unido (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006)	México (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006)	Philipinas (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006)	Estados Unidos (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006)	Japão (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006)	Cidade de Ribeirão Preto Brasil (NISHIMURA et al., 2013)	
Ácidos graxos saturados													
C8:0	0,0292 ± 7,23e-07	0,12 ± 0,05	NI	0,2 ± 0,01	0,17 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,17 ± 0,0	0,2 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,29 ± 0,1
C10:0	2,23 ± 0,40	1,02 ± 0,17	NI	1,62 ± 0,04	1,66 ± 0,05	1,87 ± 0,06	1,67 ± 0,06	1,84 ± 0,05	1,46 ± 0,04	2,35 ± 0,06	1,5 ± 0,05	2,00 ± 0,05	1,95 ± 0,5
C12:0	7,90 ± 0,86	3,71 ± 0,70	6,24 ± 1,91	5,49 ± 0,22	5,25 ± 0,23	6,15 ± 0,34	4,24 ± 0,26	4,99 ± 0,24	4,97 ± 0,23	13,82 ± 0,47	4,4 ± 0,22	5,86 ± 0,24	7,46 ± 2,6
C14:0	8,01 ± 1,0	3,98 ± 0,62	6,09 ± 1,47	6,28 ± 0,23	5,84 ± 0,27	6,8 ± 0,34	3,61 ± 0,23	5,87 ± 0,23	5,57 ± 0,24	12,12 ± 0,39	4,91 ± 0,23	6,11 ± 0,25	6,81 ± 2,3
C15:0	0,0194 ± 2,09e-07	0,21 ± 0,02	0,29 ± 0,08	0,39 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,23 ± 0,1
C16:0	21,7 ± 0,62	20,01 ± 0,43	20,25 ± 1,56	22,26 ± 0,31	18,67 ± 0,32	18,79 ± 0,30	18,62 ± 0,26	22,59 ± 0,31	19,91 ± 0,25	23,02 ± 0,28	19,26 ± 0,29	20,2 ± 0,25	19,5 ± 2,0
C17:0	0,0209 ± 2,16e-07	0,32 ± 0,01	0,35 ± 0,06	0,41 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,29 ± 0,1
C18:0	5,98 ± 0,52	6,76 ± 0,51	6,66 ± 0,71	6,77 ± 0,20	5,83 ± 0,12	5,77 ± 0,16	6,13 ± 0,14	6,25 ± 0,15	6,07 ± 0,15	4,75 ± 0,13	6,21 ± 0,18	6,14 ± 0,16	5,82 ± 1,0
C20:0	0,0332 ± 6,54e-07	0,2 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,009 ± 0,0
C22:0	0,0419 ± 1,09e-06	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,00	0,1 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,03 ± 0,0
Total	45,8	36,39	40,09	43,7	38,37	40,53	36,07	42,44	39,07	56,98	37,33	41,43	42,39
Ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs)													
C14:1	0,0232 ± 5,47e-07	0,1 ± 0,02	0,19 ± 0,05	0,31 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,28 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,50 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,19 ± 0,1
C16:1	2,23 ± 0,43	0,07 ± 0,01	1,94 ± 0,32	2,97 ± 0,11	2,79 ± 0,12	2,7 ± 0,1	1,88 ± 0,05	2,85 ± 0,12	2,64 ± 0,09	4,59 ± 0,15	2,64 ± 0,11	2,56 ± 0,08	2,11 ± 0,7
C17:1	0,0153 ± 4,34e-07	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,34 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,27 ± 0,27	0,17 ± 0,00	0,27 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,18 ± 0,0
C18:1n9t	0,0433 ± 7,50e-07	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	0,28 ± 0,1
C18:1n9c	28,9 ± 1,74	27,45 ± 1,06	35,17 ± 2,74	32,23 ± 0,44	35,18 ± 0,5	26,19 ± 0,46	36,49 ± 0,45	33,28 ± 0,4	30,79 ± 0,44	21,85 ± 0,51	32,77 ± 0,48	31,43 ± 0,40	26,46 ± 2,8
C22:1n9	0,0440 ± 1,05e-06	0,09 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,08 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,14 ± 0,01	1,21 ± 0,14	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,04 ± 0,0
Total	31,26	27,89	37,43	35,93	38,61	29,48	39,81	36,78	33,95	27,24	35,97	34,57	29,26
Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs)													
C18:2n6c	17,7 ± 1,29	23,2 ± 1,12	14,28 ± 3,97	10,66 ± 0,34	11,48 ± 0,42	17,75 ± 0,58	14,88 ± 0,42	10,45 ± 0,41	16,05 ± 0,51	7,90 ± 0,24	14,78 ± 0,39	12,66 ± 0,25	20,96 ± 4,4
C18:3n3	1,63 ± 0,21	1,82 ± 0,16	0,51 ± 0,12	0,9 ± 0,04	1,22 ± 0,05	1,14 ± 0,07	2,02 ± 0,06	1,22 ± 0,06	1,05 ± 0,06	0,43 ± 0,02	1,05 ± 0,05	1,33 ± 0,05	1,54 ± 0,4
C20:2	0,0379 ± 5,31e-07	0,03 ± 0,01	0,24 ± 0,05	0,2 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,54 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,25 ± 0,01	NI
C20:4n6	0,496 ± 0,11	0,54 ± 0,06	0,42 ± 0,10	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,48 ± 0,1
C22:6n3	0,85 ± 0,45	0,91 ± 0,15	0,28 ± 0,15	0,23 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,43 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,03	0,74 ± 0,05	0,17 ± 0,02	0,99 ± 0,08	0,09 ± 0,1
Total	20,7	26,5	15,73	12,37	13,45	20,28	18,13	12,49	18,12	9,69	16,72	15,63	23,07

Médias dos teores de ácidos graxos saturados, MUFAs e PUFAs do LH obtido BLH da cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, comparadas às observadas em outros países, sendo analisado em alguns destes países regiões específicas do mesmo (Taiwan – Regiões de Taipei e Kaohsiung; Espanha – Região da Galícia; Brasil - Cidade de Ribeirão Preto).

Esta variação nas concentrações de ácidos graxos saturados observada em diferentes países e inclusive em diversas regiões do próprio Brasil pode ocorrer em função das dietas das nutrízes, que se relacionam com as culturas e costumes locais (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006).

Os ácidos graxos saturados mais abundantes foram o ácido palmítico (C16:0 – 21,7%), ácido mirístico (C14:0 – 8,01%), ácido láurico (C12:0 – 7,9%) e ácido esteárico (C18:0 – 5,98%) corroborando com o encontrado na literatura para outros países. Foram observados também, em menores concentrações, ácido caprílico (C8:0 – 0,0292%), ácido cáprico (C10:0 – 2,23%), ácido pentadecanoico (C15:0 – 0,0194%), ácido margárico (C17:0 – 0,0209%), ácido araquídico (C20:0 – 0,0332%) e ácido behênico (C22:0 – 0,0419%), como apresentado na Tabela 7.

Os ácidos graxos de cadeia média como ácido caprílico (C8:0) e ácido cáprico (C10:0), são importantes fontes de energia, pois, devido ao seu tamanho podem ser facilmente absorvidos pelo sistema sanguíneo e transportados diretamente ao fígado onde são rapidamente oxidados gerando energia (CHNADHAPURAM; SUNKIREDDY, 2012).

O aporte rápido de energia pelo organismo ocasiona maior ganho de peso e rápido desenvolvimento do lactente, sendo importante em todos os neonatos, mas de extrema importância no caso de neonatos a termo nascidos com baixo peso, que necessitam de um desenvolvimento mais amplo e rápido, garantindo assim sua saúde e menor tempo de internação.

Bergsson et al. (2001) associaram o ácido cáprico (C10:0) à ação antibacteriana em estudos *in vitro* com certos ácidos graxos.

Kim e Friel (2012) relacionaram dietas contendo grandes quantidades de carboidratos com altos teores de ácido láurico (C12:0) e ácido mirístico (C14:0). A média de ácido láurico observada neste estudo está acima dos valores da literatura em outros países do mundo, exceto da Filipinas (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006). Este dado está próximo ao descrito para a cidade de Ribeirão Preto, Brasil (NISHIMURA et al., 2013).

Os teores de ácido mirístico (C14:0) também estão acima da média da maioria dos países listados na Tabela 7 e abaixo das Filipinas. O ácido mirístico tem sido associado a consequências negativas à saúde, como acúmulo de colesterol e doenças cardíacas (RIOUX; PÉDRONO; LEGRAND, 2011). Entretanto, a capacidade do ácido mirístico de modificar atividades enzimáticas e funções proteicas, a partir da miristoilação do N-terminal de proteínas demonstra que o mesmo pode apresentar um papel regulatório no organismo (TOWLER et al., 1988). O Miristoil-CoA é formado a partir da ativação do C14:0 pela acyl-CoA sintetase e

desempenha um papel na regulação de funções proteicas com a modificação covalente das proteínas (RIOUX; PÉDRONO; LEGRAND, 2011). O consumo e a presença do ácido mirístico no organismo, podem auxiliar na conversão de ácidos graxos ω 3 em seus precursores como EPA (C20:5n3) e DHA (C22:6n3) (DABADIE et al., 2005; RIOUX et al., 2005, 2008; RIOUX; PÉDRONO; LEGRAND, 2011). Assim, o alto teor de C14:0 pode estar relacionado à abundância de DHA encontrado no LH analisado.

O ácido palmítico (C16:0), com teor 21,6%, é, após o ácido oleico (C18:1n9c), o AG mais abundante presente no LH analisado. A percentagem encontrada está dentro dos dados da literatura (~20%) para a Austrália, Galícia, o México, Reino Unido e o Brasil (cidade de Ribeirão Preto), como visto na Tabela 7. O teor de ácido palmítico no leite humano está associado ao consumo de alimentos ricos em óleos de palma e de coco (DELPLANQUE et al., 2015), carne e produtos lácteos (BARREIRO et al., 2018), sendo também sintetizado pelo organismo por meio do complexo enzimático ácido graxo sintetase (KIM; FRIEL, 2012).

O ácido palmítico está associado com a absorção de minerais, como o cálcio, e assim com o desenvolvimento ósseo do lactente, estando também relacionado com a absorção de outros ácidos graxos pelo organismo e com o conforto intestinal (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2001; PETIT; SANDOZ; GARCIA-RODENAS, 2017). O C16:0 no leite humano ocupa a posição sn2 no triacilglicerol, diferenciando-o do leite de outros mamíferos, assim como de fontes lipídicas vegetais. Até 50% do ácidos graxos presentes na posição sn2 dos lipídios do LH é de ácido palmítico (INNIS, 2011). As lipases quebram inicialmente as posições sn1 e sn3 do triacilglicerol, deixando um monoacilglicerol ligado à posição sn2. Essa posição torna o C16:0 mais solúvel e permite que seja mais facilmente absorvido pelo intestino (BAR-YOSEPH et al., 2016).

Os ácidos graxos de cadeia ímpar como o ácido pentadecanoico (C15:0) e ácido heptadecanoico (C17:0) são observados em baixas quantidades na natureza. Podem ser obtidos a partir de dietas ricas em gorduras lácteas (BARREIRO et al., 2018). No presente estudo, as proporções de C15:0 (0,0194%) e C17:0 (0,0209%) foram menores do que as quantidades observadas no leite dos outros países listados na Tabela 7.

O ácido araquídico (C20:0) se encontra em concentrações de até seis vezes menores que a maioria dos teores de outros países da literatura, mas está acima dos valores brasileiros. O ácido behênico (C22:0) se encontra em concentrações de até duas vezes menores que a maioria dos teores de outros países, mas está 1,4 vezes acima dos valores brasileiros na região de Ribeirão Preto, como observado na Tabela 7. Os ácidos araquídico e behênico estão

associados ao desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico (TOLLIN et al., 2005).

Apesar das variações observadas nos ácidos graxos a cada coleta do LHO do BLH da cidade de Viçosa, verificou-se que estes se mantêm em boas condições nutricionais neste quesito quando comparados com os dados encontrados na literatura.

4.2.2. Ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs)

Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) do LH analisado apresentaram uma concentração média de 31,26%, sendo o ácido oleico (C18:1n9c) encontrado em maior abundância (28,9%), seguido pelo ácido palmitoleico (C16:1 – 2,23%), o que condiz com o encontrado na literatura. Foram identificados também, ácido miristoleico (C14:1), ácido 10-heptadecenoico (C17:1), ácido elaidico (C18:1n9t) e ácido euríico (C22:1n9).

Como mostrado na Tabela 7, as médias de ácido oleico (C18:1n9c – 28,9%) são maiores que as reportadas para Taiwan, Chile, Philipinas e Brasil. A China apresentou o maior teor de ácido oleico (36,49%) no LH.

O ácido oleico atua sobre a saúde humana, com efeito direto nas concentrações do colesterol LDL e HDL (ESTÉVEZ-GONZÁLEZ et al., 2010); na prevenção de doenças cardiovasculares (HØSTMARK; HAUG, 2013), pois afeta o teor de colesterol; na vasodilatação; no controle da pressão sanguínea (RYAN et al., 2000); e, na prevenção e tratamento da diabetes mellitus, pois atua no controle da insulina (RYAN et al., 2000).

O ácido oleico se destaca em dietas pobres em ácidos graxos essenciais, pois é capaz de ser convertido em ácido de Mead (C20:3n9) (HØSTMARK; HAUG, 2013) e tem uma relação inversa com o ácido araquidônico (HAUG; OLESEN; CHRISTOPHERSEN, 2010; HØSTMARK; HAUG, 2013), entretanto neste trabalho não encontramos uma correlação significativa a $p \leq 0,05$ entre o ácido oleico e ARA.

O ácido oleico e o ácido palmitoleico são os ácidos graxos monoinsaturados mais abundantes do leite humano. Mesmo assim, não existem muitas informações sobre os mecanismos de suas atuações no organismo do lactente. Assim, suas funcionalidades precisam ser estudadas (DELPLANQUE et al., 2015). Os teores médios de ácido palmitoleico observados neste estudo estão acima dos reportados para Taiwan, Galícia, China e Brasil, como exposto na Tabela 3. As Philipinas exibiram a maior média de ácido palmitoleico (4,59%) no LH, mais que o dobro do observado neste estudo.

O ácido eláidico (C18:1n9t) encontrado no leite presentemente avaliado, não foi descrito no LH dos países listados na Tabela 3, à exceção do leite humano brasileiro (NISHIMURA et al., 2013). Este comportamento pode estar relacionado a semelhanças na alimentação e na genética da população brasileira, mesmo não sendo da mesma região do país.

4.2.3. Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs)

Os ácidos graxos poli-insaturados do leite humano são provenientes da dieta, dos lipídios hepáticos e de tecidos adiposos presentes como reserva do organismo materno (DEMMELMAIR; KOLETZKO, 2018). O valor médio dos teores de PUFAs do LH analisado foram de 20,70%. O mais abundante foi o ácido linoleico (C18:2n6c – LA; 17,7%), seguido pelo ácido docosa-hexaenoico (C22:6n3 – DHA; 0,85%) e pelo ácido linolênico (C18:3n3 – ALA; 1,63%). As menores concentrações foram observadas para o ácido araquidônico (C20:4n6 – ARA; 0,496%) e o ácido eicosadienóico (C20:2; 0,0379%), como demonstrado na Tabela 3.

O ácido linoleico no LH estudado se encontra em concentrações médias próximas às observadas para o Chile e México, está abaixo de Taiwan e do Brasil, e acima dos outros países avaliados na Tabela 3.

As concentrações de ácido linolênico foram próximas às observadas para a média brasileira, abaixo da China e Taiwan e acima dos outros países listados na Tabela 3.

Os teores dos ácidos graxos linoleico (C18:2n6) e linolênico (C18:3n3) são altamente susceptíveis a mudanças na dieta materna (DELPLANQUE et al., 2015). Estes são ácidos graxos essenciais que agem como precursores dos ácidos araquidônico (ARA) e docosa-hexaenóico (DHA), respectivamente, sendo estes também constituintes do LH.

As conversões de ácido linolênico em DHA e de ácido linoleico em ARA seguem a mesma via metabólica e fazem uso das desnaturases $\Delta 6$ e $\Delta 5$, respectivamente (INNIS, 2009). As conversões pela mesma via metabólica provocam um elevado consumo de ω -6 (NOVAK; DYER; INNIS, 2008) e a uma alta relação AL:ALA (KOLETZKO et al., 2013). Esse comportamento é corroborado pela observação na Tabela 6 de uma correlação existente entre os teores de AL e ALA no leite humano.

As quantidades absolutas de AL e ALA podem influenciar, e até mesmo reduzir, as conversões de ácido linoleico em ácido araquidônico e de ácido linolênico em ácido docosa-hexaenoico (GOYENS et al., 2006). Neste trabalho (Tabela 6) verificou-se uma correlação negativa entre o ácido linoleico e o ácido docosa-hexaenoico, indicando uma possível influência

das concentrações de AL em relação aos teores de DHA. Entretanto não foi observada correlação significativa ($p \geq 0,05$) entre os teores de AL e ARA ou de ALA e DHA.

Os níveis de DHA presentes no leite materno são muito variáveis e estão relacionados diretamente à alimentação materna (BRENNAN et al., 2007; INNIS, 2014), como por exemplo, pelo consumo de animais marinhos (DELPLANQUE et al., 2015), ingestão de ácido linolênico, posto que o ácido linolênico é metabolizado e convertido em DHA no fígado (INNIS, 2009) e pela suplementação com DHA (JUBER et al., 2017).

Em casos de nascimento pré-maturo, o LH apresenta percentagens mais elevadas de DHA (LAPILLONNE et al., 2013).

A suplementação materna com DHA durante a gravidez e amamentação leva a um teor moderadamente mais elevado deste ácido graxo no sangue (JUBER et al., 2017; SCHUCHARDT et al., 2017) aumentando também os teores deste ácido graxo no leite materno (ROBINSON et al., 2017).

O conteúdo de DHA observado no LHO avaliado foi superior ao dos outros países listados na Tabela 7, estando abaixo apenas daqueles avaliados no Japão e em Taiwan, que exibiram concentrações elevadas de DHA. Embora a cidade de Viçosa, MG, Brasil, não se encontre em uma região litorânea, a suplementação alimentar com $\omega 3$ por indicação médica e o fato do leite do BLH ser proveniente, em sua grande maioria, de mães de lactentes nascidos prematuramente, podem ter contribuído para os altos teores de DHA encontrados neste estudo.

Os valores de ARA, conquanto estejam na faixa das médias dos países listados na Tabela 7, são inferiores em até cerca de duas vezes aos de DHA. As proporções ARA:DHA no LH são de 2:1 para a maioria dos países avaliados. Japão, Taiwan e Philipinas exibem proporções de aproximadamente 1:2 de ARA:DHA assim como neste trabalho, e o Chile de 1:1 (ARA:DHA). Conforme Delplanque et al. (2015), países ocidentais comumente apresentam no LH uma relação ARA:DHA de 2:1. Apesar da relação existente entre os teores de ARA e DHA, não foi observada neste trabalho uma correlação significativa entre estes ácidos graxos.

Os ácidos graxos ARA e DHA atuam no desenvolvimento e síntese das membranas neurais, o que afeta o desenvolvimento dos sistemas cognitivo e visual (HOFFMAN; BOETTCHER; DIERSEN-SCHADE, 2009).

O DHA está presente nos tecidos nervosos e é considerado um dos mais importantes AG do LH. Seu acúmulo se inicia intrauterinamente e continua, em grandes quantidades, até os dois anos de vida, período em que ocorre um rápido desenvolvimento do sistema nervoso central (INNIS, 2009; DELPLANQUE et al., 2015; DEMMELMAIR; KOLETZKO, 2018).

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que as variações geradas pelo processamento de pasteurização e homogeneização seguido de pasteurização do leite humano analisado, não influenciam em sua capacidade nutricional.

Além disso pode-se constatar que o leite humano analisado mesmo se encontrando em não conformidade pela presença de sujidades, ainda mantém como ótima fonte de nutrientes específicos essenciais ao desenvolvimento do lactente.

Os resultados encontrados apresentaram variações esperadas no perfil de ácidos graxos, em decorrência da fisiologia da lactação, do momento da coleta e sua origem em diferentes doadoras. Entretanto, mesmo com a variabilidade, tanto os teores de ácidos graxos quanto as proporções dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados mantiveram-se dentro das faixas das médias reportadas para outros países.

Assim, o conteúdo do ácido palmítico na faixa encontrada na literatura, demonstra que o leite estudado, possui capacidade para auxiliar no desenvolvimento ósseo. Os valores de DHA, acima da média, indicam a excelência do leite para ajudar na formação dos sistemas nervoso e visual do lactente.

Portanto, a distribuição e conteúdo dos diferentes tipos de ácidos graxos demonstram que o leite humano avaliado é uma fonte destes nutrientes específicos e poderia ser utilizado na alimentação após a operação filtração e pasteurização, além do desenvolvimento de produtos para a fortificação do LHP utilizado no BLH.

CAPÍTULO 3 – INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO NO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO POOL DE LEITE HUMANO NÃO CONFORME

Resumo: O conteúdo de ácidos graxos do leite humano não conforme pode ser afetado por diferentes condições operacionais de processamento e armazenamento. Além disso, o conhecimento das mudanças no perfil dos ácidos graxos do leite humano pode ajudar a indicar sua utilização em determinado período de armazenamento, de acordo com a necessidade específica de cada recém-nascido. As alterações nos perfis de ácidos graxos de três tipos de leite humano, cru, pasteurizado (62,5°C; 30 min) e homogeneizado (40°C; 30 s) - pasteurizado (62,5°C; 30 min) foram estudadas durante o armazenamento por seis meses em um freezer a -18°C. Foram observadas variações nas concentrações de PUFA, sendo mais drásticas para o DHA com redução de quase 50% do seu total. Variações nos teores de ácido palmítico e esteárico foram observadas pela alteração das condições de processamento e armazenamento. Foi verificada uma correlação entre a redução da cadeia longa de ácidos graxos e o aumento das cadeias média e curta. Assim, as alterações do perfil lipídico do leite humano dependem das condições operacionais de processamento e armazenamento, que mesmo com a ocorrência de algumas perdas nutricionais, os benefícios do processamento, como maior volume de LHO viável ao consumo, ou maior tempo de armazenamento, além de melhores indicações do uso do LHO, podem compensar estas perdas.

Palavras-chave: Cromatografia gasosa. Lipídios. Nutrição. Pré-termo. Armazenamento.

1. INTRODUÇÃO

Os lipídios são os componentes presentes no leite humano que fornecem energia aos bebês (DEMMELMAR; KOLETZKO, 2018) e ácidos graxos, essenciais para o desenvolvimento do recém-nascido e o bom funcionamento do organismo (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006). A composição dos lipídios do leite humano é majoritária em triacilgliceróis (98%), contendo fosfolipídios (0,8%), colesterol (0,5%) e outros compostos (KIM; FRIEL, 2012). Dentre os ácidos graxos presentes no leite humano, que fazem parte do desenvolvimento do sistema cognitivo do recém-nascido, encontram-se os ácidos araquidônico (ARA) e docosahexaenóico (DHA) (JUBER et al., 2017). O ácido palmítico (C16: 0) é outro ácido graxo relevante. Ele está localizado na posição sn-2 do triacilglicerol, facilitando sua absorção pelo corpo do bebê. Além disso, o C16: 0 atua no desenvolvimento ósseo do neonato, auxiliando na absorção de cálcio e outros ácidos graxos (SUN et al., 2018).

O leite humano é o alimento completo do recém-nascido, sendo tão importante que além de sua função primária, nutrir, tem se tornado um auxiliar no tratamento de neonatos prematuros hospitalizados com doenças como a enterocolite necrosante (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006; DEMMELMAR; KOLETZKO, 2018). Bebês em Unidade de Terapia Intensiva

Neonatal (UTIN) muitas vezes não conseguem sugar o leite materno. Nestes casos, uma opção para a sua alimentação é o leite humano ordenhado (LHO) obtido de doações da mãe ou de uma doadora (QUIGLEY; EMBLETON; McGUIRE, 2018). Após ser coletado, pasteurizado e congelado para uso posterior, esse leite pode ser armazenado por até seis meses. Mesmo em condições de congelamento, a oxidação lipídica pode ocorrer durante o armazenamento dos alimentos, alterando o perfil de ácidos graxos dos alimentos (MARIUTTI; NOGUEIRA; BRAGAGNOLO, 2011). A oxidação lipídica ocorre, preferencialmente em ácidos graxos insaturados, como os ácidos linoleico, oleico e linolênico, devido à presença de sua dupla ligação (NAH et al., 2013; VIEIRA; ZHANG; DECKER, 2017).

Assim, conhecer as alterações no perfil lipídico e o conteúdo nutricional dos lipídios do leite humano oriundas de seu processamento e armazenamento é essencial. No entanto, pequeno número de relatos sobre esse tema específico são apresentados na literatura. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar as alterações no perfil de ácidos graxos do leite humano não conforme quando submetido ao processamento e armazenamento sob congelamento por até 180 dias.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostra

O leite humano coletado e ordenhado utilizado em nossos experimentos foi proveniente do banco de leite humano (BLH) do Hospital São Sebastião (HSS) da cidade de Viçosa, MG, Brasil, e seria descartado devido à presença de pelos ou pele encontrados nas análises de rotina. Todo o leite doado ao HSS-HMB passa por análises sensoriais e físico-químicas anteriores a qualquer tratamento (BRASIL, 2006). Todo o material estava em frascos de vidro, conforme regulamentação brasileira (BRASIL, 2006).

Nove frascos de leite humano ordenhado, doado na fase madura da lactação, foram transportados para o laboratório sob refrigeração. O conteúdo de cada frasco foi filtrado (papel qualitativo Whatman 1-125 mm, 45 µm) para remoção da sujidade, e foi dividido em três amostras. Duas destas três amostras foram processadas, uma nas condições do processo pasteurizado e outra nas condições do processo homogeneizado seguido pelas condições do processo pasteurizado. As amostras foram armazenadas como leite humano cru (LHOc), leite humano pasteurizado (LHO_p) e leite humano homogeneizado-pasteurizado (LHO_{hp}). Todas as amostras foram caracterizadas com base no teor de ácidos graxos durante 180 dias de

armazenamento, em intervalos de 30 dias. O dia da coleta das amostras de leite foi representado pelo tempo zero. Todas as análises foram realizadas em triplicata para reduzir o erro experimental.

As variações das concentrações de ácidos graxos no leite humano ordenhado foram avaliadas nas três condições: leite cru, leite pasteurizado e leite homogeneizado-pasteurizado. As composições de ácidos graxos foram analisadas a cada 30 dias durante 180 dias de armazenamento para determinar as mudanças no perfil de ácidos graxos. T0 representa o dia da coleta do leite no HSS, T1 30 dias de armazenamento após a coleta do leite, T2 60 dias de armazenamento, T3 90 dias até T6, que representa 180 dias de armazenamento do leite humano.

2.2. Análise físico-química

A qualidade do leite humano foi avaliada por meio de análises físico-químicas (ALMEIDA; GUIMARÃES; NOVAK, 2020), acidez Dornic, extrato seco por gravimetria e teor de lipídios por Bligh e Dyer (1959).

2.3. Análise microbiológica

O leite humano foi caracterizado por análise microbiológica para garantir a segurança alimentar. A metodologia do número mais provável (MNP) foi usada com caldo lauril sulfato de sódio (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

2.4. Pasteurização

O leite humano cru foi pasteurizado para eliminar os microrganismos contaminantes, mantendo-o em banho-maria com controle termostático (Tecnal, Brasil) a 62,5°C por 30 min.

2.5. Homogeneização

O leite humano cru a 40°C foi homogeneizado por sonicação (sonicador ultrassônico VCX750, Newtown, EUA) utilizando uma sonda de 13 mm, frequência de 20 kHz, intensidade de 75% por 30 s.

O leite humano homogeneizado-pasteurizado (HPMH) foi obtido por meio da homogeneização do leite cru, seguida da pasteurização.

2.6. Extração de lipídios

A metodologia de extração de lipídios foi adaptada de Bligh e Dyer (1959). O leite foi descongelado a 40°C em banho termostático (Tecnal, Brasil), e uma massa de 0,5 g foi pesada em balança analítica (Shimadzu, Japão). O volume de 3 mL de uma mistura de metanol: clorofórmio de 2:1 foi adicionado ao sistema de extração de lipídios. A mistura foi mantida sob agitação em mesa agitadora (Tecnal, Brasil) por 30 min, seguida da adição de 1 mL de clorofórmio e 1,8 mL de solução salina (0,9 g/mL de NaCl). Após a divisão das três fases, o fundo (~ 2 mL) foi pipetado, seco (45°C) em banho seco (Labnet, EUA) e a massa de lipídios determinada por gravimetria. As fases superior e intermediária foram descartadas em frascos apropriados.

2.7. Derivação

A amostra para a caracterização de ácidos graxos foi preparada pelo método de transesterificação direta que foi adaptado da metodologia descrita por Martinez et al. (2012), na qual foi adicionada em um frasco de derivatização 100 microlitros de um padrão de C11 como padrão interno, em solução de 10 mg/ml em hexano, então evaporado o hexano e posteriormente adicionado 15 mg de óleo, adicionar 1 ml de solução de KOH 1M em etanol 70%, manter os frascos em banho seco por uma hora para saponificação a uma rotação de 200 rpm em mesa agitadora (Marconi, MA 140/CF). Posteriormente, adicionar 300 µl de HCl 8M. Adicionar 2 ml de hexano e 1 ml de solução de NaCl a 0,9% (m/v), levar a aparelho de vortex e posteriormente deixar sob repouso para separação de fases. Pipetar 1 ml do sobrenadante para outro frasco e realizar lavagem da amostra com 1 ml de hexano por cinco vezes. Secar a amostra em estufa a 65°C para remoção do hexano. Adicionar 2 ml de H₂SO₄ 2% (v/v) em metanol e levar em banho seco a 90°C por 90 minutos. Após este procedimento, adiciona-se 1 ml de solução de NaCl 0,9% (m/v) e 2 ml de hexano. Coletar 1 ml do sobrenadante e o transfere para um ependorf contendo 0,1 g de sulfato de sódio anidro. Procede-se agitação em vortex (Phoenix Luferto, Brasil) por um minuto, posteriormente uma centrifugação a 2800 RCF por 15 minutos (Eppendorf, Alemanha) e coleta-se 500 microlitros do sobrenadante ao qual foi adicionado 500 microlitros de hexano em frasco vial apropriado e posteriormente levado ao Cromatógrafo Gasoso (Shimadzu, GC-2010, Japão) usando uma coluna capilar de 100 m x 0,25 mm (SP-2560, Sigma Aldrich, EUA), para que seja realizada a caracterização dos ácidos graxos.

Os ácidos graxos foram identificados por meio dos tempos de retenção dos FAMES da amostra comparados aos tempos de retenção da mistura padrão FAME (Supelco, 37 componentes FAMES Mix, Sigma Aldrich, EUA). Três repetições foram realizadas para a análise de cada amostra.

2.8. Análise de dados

Os dados observados foram analisados estatisticamente usando um desenho completamente aleatório no programa R versão 3.3.3 (R - THE R..., 2019). O teste de Scott-Knott foi utilizado para avaliar as médias a 5% de significância. A normalidade residual foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, a 5% de significância, e a homogeneidade da variância foi analisada pelo teste de Bartlett, a 5% de significância. A correlação entre os ácidos graxos foi avaliada pelo método de correlação de Pearson a 5% de significância.

3. RESULTADOS

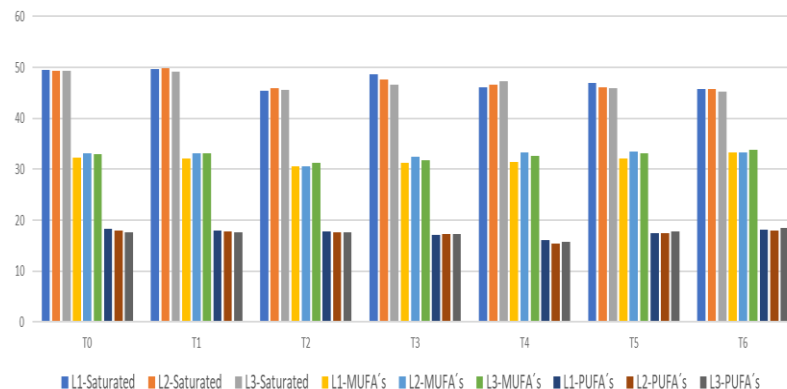
Não houve crescimento microbiano nas análises microbiológicas, demonstrando que o LHO analisado não possuía contaminação.

A média da acidez observada no LHO foi de 17^oD, sendo que nenhuma amostra apresentou acidez maior que 18^oD. Já a média de lipídios no LHO analisado foi de 3,3 g/100 g de LHO.

3.1. Leite humano ordenhado cru

Para o leite humano cru (EHL), conforme mostrado na Figura 4, observa-se (i) um predomínio de ácidos graxos saturados (47,24%), seguidos dos ácidos graxos monoinsaturados (32,44%) e poli-insaturados (17,45%), (ii) mudanças nos valores médios das concentrações de ácidos graxos, (iii) um declínio constante dos conteúdos de PUFAs, (iv) várias flutuações nos níveis de MUFAs, (v) manutenção das concentrações de ácidos graxos saturados nos tempos T0 e T1, (vi) diminuição das concentrações de ácidos graxos saturados nos tempos de T2 a T6, (vii) que a variação do conteúdo de PUFA (docosahexaenóico [DHA], araquidônico [ARA], eicosapentaenoico [EPA], linoleico [LA], alfa linolênico [ALA] e ácidos oleico) no início do armazenamento foi mais intensa do que dos ácidos graxos saturados, e (viii) uma alta redução dos valores de ácidos graxos saturados para T5 e T6.

Figura 4 – Ácidos graxos saturados, MUFAs e PUFAs durante o tempo de armazenamento



(L1): Leite humano cru. (L2): Leite humano pasteurizado. (L3): Leite humano homogeneizado-pasteurizado. Tempo de armazenamento: T0 a T6.

3.2. Leite humano pasteurizado e leite humano homogeneizado-pasteurizado

A Tabela 8 mostra que o leite humano após o processamento apresentou maiores teores de ácidos graxos de cadeia longa, como EPA, ARA, ALA, ácido oleico e ácido palmítico, do que o leite cru. A composição de DHA e ácido linoleico no leite cru eram maiores do que após o processamento (DHA: ~ 10%; ácido linoleico: (~ 4%). As condições de processamento do leite levaram a uma redução nas concentrações de ácidos graxos de cadeia longa devido à sua conversão em ácidos graxos de cadeia curta, comportamento já relatado para a conversão enzimática de ácidos graxos de cadeia longa em curta (DAVIDOFF; KORN, 1964).

Durante a oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa por β -oxidação, ocorre a formação dos ácidos graxos de cadeia curta que posteriormente serão também oxidados (LEBER et al., 2016). O leite humano possui compostos antioxidantes que proporcionam uma ampla capacidade antioxidante (OVEISI et al., 2010) e assim a capacidade de reduzir as reações de oxidação e paralisar essas reações (HASHEMI et al., 2017). A interrupção das reações de oxidação provoca um aumento na concentração de ácidos graxos de cadeia curta (LEBER et al., 2016).

Tabela 8 – Composição dos ácidos graxos do leite humano em diferentes condições de processo e tempos de armazenamento

	C16:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3	C20:4n6	C20:5n3	C22:6n3
L1 T0	23.081bB	28.712cE	15.702aB	1.739cB	0.0437cD	0.0707cA	0.695aA
L2 T0	22.727cB	29.816aE	15.296bC	1.894aA	0.0491aD	0.0748bA	0.631bA
L3 T0	23.091aA	29.504bE	14.958cE	1.827bB	0.0471bE	0.0791aA	0.625cA
L1 T1	23.014bC	28.718cD	15.477aC	1.732cC	0.0401bF	0.0700cB	0.693aA
L2 T1	22.973cA	29.841aD	15.252bD	1.802bB	0.0403bG	0.0721bB	0.633bA
L3 T1	23.024aB	29.559bD	14.941cF	1.823aB	0.0474aDE	0.0791aA	0.626cA
L1T2	20.938cG	27.533cG	15.371aD	1.765bA	0.0512cC	0.0162bE	0.507aB
L2 T2	21.456aG	27.857bG	15.143cE	1.897aA	0.0583aB	0.0159cE	0.490bB
L3 T2	21.353bG	28.695aG	15.345bC	1.730cD	0.0537bB	0.0173aE	0.490bB
L1 T3	23.163aA	28.506cF	15.037bF	1.533cF	0.0516aC	0.0128bF	0.499aC
L2 T3	22.558bE	29.514aF	15.039bF	1.695aD	0.0442cE	0.0118cG	0.487bC
L3 T3	21.940cF	28.999bF	15.060aD	1.637bE	0.0476bD	0.0139aF	0.462cC
L1 T4	22.771aD	28.969cC	14.152aG	1.381aG	0.0428bE	0.0125cF	0.492aD
L2 T4	22.636bD	30.533aB	13.496cG	1.271cF	0.0418cF	0.0608bC	0.481bD
L3 T4	22.565cC	29.947bC	13.853bG	1.366bF	0.0484aC	0.0729aB	0.456cD
L1 T5	22.268bE	29.250cB	15.262cE	1.687bE	0.0657aA	0.0190bD	0.377aE
L2 T5	22.664aC	30.730aA	15.444bB	1.605cE	0.0557cC	0.0147cF	0.303cF
L3 T5	22.225cE	30.406bB	15.617aB	1.779aC	0.0603bA	0.0202aC	0.354bE
L1 T6	22.170cF	30.458cA	15.915bA	1.692cD	0.0604bB	0.0205aC	0.356aF
L2 T6	22.537aF	30.506bC	15.866cA	1.736bC	0.0612aA	0.0202bD	0.313cE
L3 T6	22.301bD	30.978aA	16.120aA	1.863aA	0.0604bA	0.0183cD	0.326bF

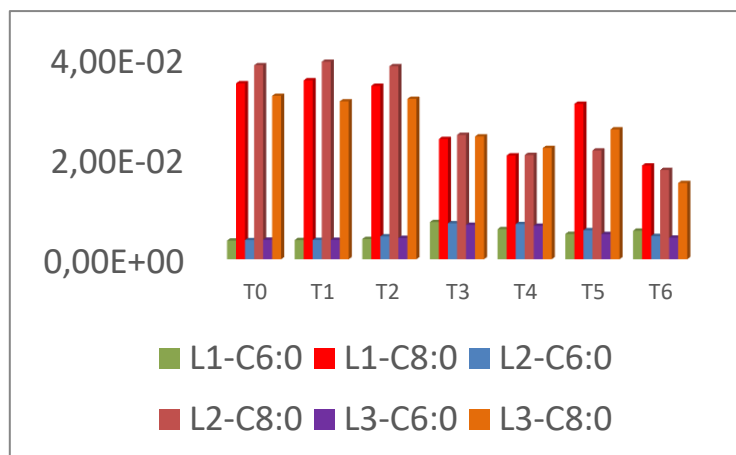
L1: Leite humano cru; L2: Leite humano pasteurizado; L3: Leite humano homogeneizado-pasteurizado. Tempos de armazenamento: 0 a 180 dias (T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6). As letras maiúsculas indicam variação por tempo de armazenamento e as letras minúsculas por tipo de processamento ($p \leq 0,05$ pelo teste de Scott-Knott).

A Figura 5 mostra o aumento no teor de ácidos graxos de cadeia curta (6 e 8 carbonos) nos primeiros 60 dias de armazenamento e a diminuição de seus níveis nos últimos 90 dias. O teor de C6: 0 aumentou e a composição de C8: 0 sofreu variação durante o armazenamento.

Os ácidos graxos poli-insaturados apresentaram seus maiores teores no início do armazenamento, com redução em seu percentual nos meses seguintes, exceto AL e ARA.

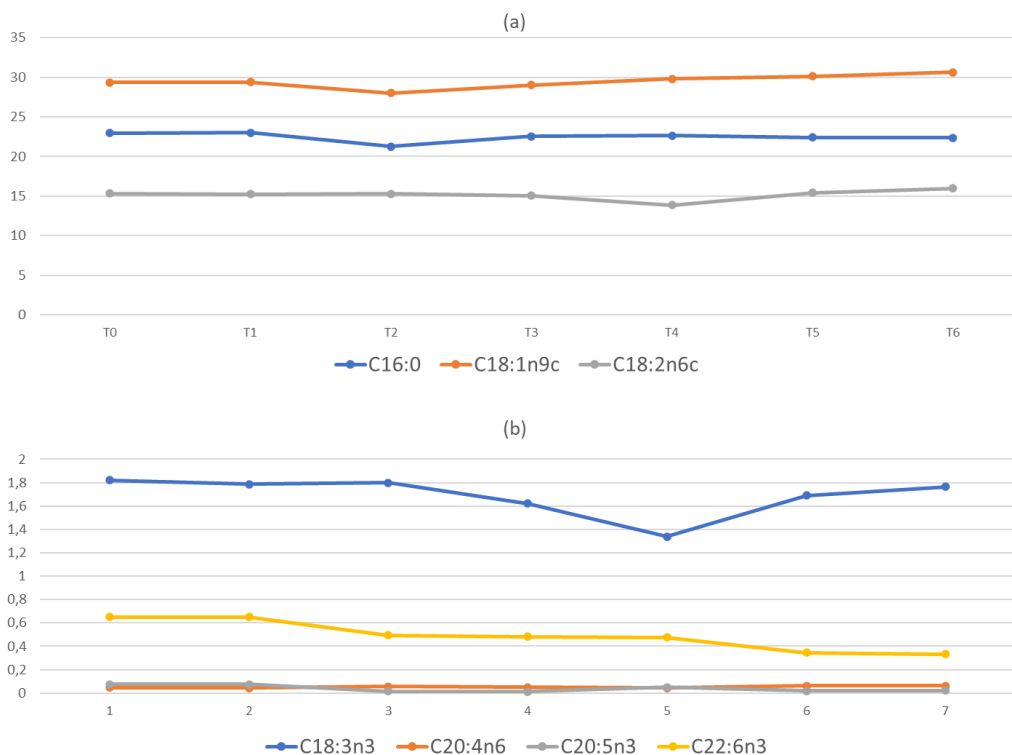
A Figura 6 mostra (i) que os teores de ácidos graxos insaturados, como ácido oleico e EPA, diminuiram nos primeiros 30 dias de armazenamento e aumentaram a partir dos 90 dias; (ii) variação ao longo do armazenamento das proporções de ácidos graxos ALA, LA, ARA e ácidos graxos saturados, palmítico e esteárico; (iii) a redução abrupta da composição de DHA nos primeiros 30 dias de armazenamento, seguida de uma diminuição suave até o final do armazenamento.

Figura 5 – Variação nos níveis C6: 0 e C8: 0 durante 180 dias de armazenamento



L1: Leite humano cru; L2: Leite humano pasteurizado; L3: Leite humano pasteurizado-homogeneizado. Tempos de armazenamento: 0 a 180 dias (T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6).

Figura 6 – Variações nas composições dos ácidos graxos durante 180 dias de armazenamento



L1: Leite humano cru; L2: Leite humano pasteurizado; L3: Leite humano pasteurizado-homogeneizado. Tempos de armazenamento: 0 a 180 dias (T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6).

3.3. Correlações

A avaliação das mudanças na composição dos ácidos graxos deixa claro que algumas dessas mudanças podem ser correlacionadas. Em relação ao processamento, o teor de DHA apresentou forte correlação negativa com ARA (-0,89) e EPA (-0,89), bem como com ácido linolênico (-0,86), oleico (-0,93), láurico (-0,99) e ácidos caproicos (-0,91). Esse comportamento sugere que tais concentrações de ácidos graxos aumentaram devido ao processamento. Assim, é ocorre uma redução nas concentrações de DHA no leite humano analisado. Por outro lado, os ácidos linoleico, araquídico e mirístico apresentaram correlações positivas com o DHA (0,92, 0,99 e 0,77 respectivamente), o que significa aumento nas concentrações de DHA com o aumento do seu conteúdo.

EPA também mostrou uma forte correlação negativa com os ácidos araquídico (-0,090), linoléico (-0,99), cis-10-heptadecanóico (-0,95) e mirístico (-0,97), e uma forte correlação positiva com os ácidos capróico (0,99), láurico (0,91) e tridecanóico (0,93).

Correlações foram verificadas entre ácidos graxos de cadeia longa, como DHA, EPA e ARA, e entre seus precursores devido à influência dos tipos de processamento nas composições de ácidos graxos. Nesse ínterim, a maioria das correlações ocorreu entre eles e ácidos graxos de médio e baixo peso molecular ($\leq C14$). No entanto, as mudanças nos ácidos graxos durante o armazenamento não foram correlacionadas com seus precursores.

Um aumento nos ácidos graxos de cadeia média e curta e uma diminuição no conteúdo dos ácidos graxos de cadeia longa foram observados para a maioria das correlações entre os ácidos graxos. Assim, ocorreu uma diminuição dos ácidos graxos de maior peso molecular por meio de sua degradação oxidativa e, conseqüentemente, uma diminuição na formação dos ácidos graxos de cadeia média e curta.

4. DISCUSSÃO

Os lipídios do leite humano atuam no desenvolvimento do recém-nascido, como o ganho de peso, responsável pela utilização de até 50% da energia fornecida pelo leite humano (GROTE et al., 2016); com o desenvolvimento dos sistemas cognitivo, visuais (HOFFMAN; BOETTCHER; DIERSEN-SCHADE, 2009) e imunológicos (TOLLIN et al., 2005) do recém-nascido; e na regulação a do organismo (RIOUX; PÉDRONO; LEGRAND, 2011), entre outras. Alguns ácidos graxos que compõem esses lipídios agem na formação e funcionamento do corpo do bebê, como DHA, ARA e EPA, que fazem parte do sistema nervoso e visual (HOFFMAN;

BOETTCHER; DIERSEN-SCHADE, 2009). O ácido palmítico ajuda a absorver outros ácidos graxos e o cálcio contribuindo com o desenvolvimento do sistema ósseo e digestivo (INNIS, 2011; BAR-YOSEPH et al., 2016).

A literatura reporta alterações no perfil de ácidos graxos do leite humano devido à idade, período de lactação e dieta materna (DROR; ALLEN, 2018). No entanto, não foram encontradas informações sobre as alterações do perfil lipídico após a ordenha, processamento e armazenamento do leite humano.

O leite humano é um material bioativo que contém lipases endógenas. Assim, condições de armazenamento adequadas são necessárias para evitar a ação dessas enzimas (GEORGE et al., 2018), e conseqüentemente, evitar alterações no perfil lipídico. Além da ação enzimática, a composição do leite humano pode ser modificada por oxidação devido à exposição ao oxigênio e à umidade.

As reações de oxidação são estimuladas pelo aumento da temperatura e alguns tratamentos físicos, que levam ao aumento da exposição de lipídios (KOH; SURH, 2015).

Os PUFA's têm pré-disponibilidade para sofrer oxidação devido à fragilidade da dupla ligação em suas cadeias (SHICHIRI et al., 2014) e apresentam alterações em suas concentrações após tratamento térmico (BATISTON et al., 2012). Porém, a degradação oxidativa também ocorre em sistemas contendo ácidos graxos saturados (KIM et al., 2013). Esse comportamento foi verificado nos ácidos graxos do leite humano analisados, para as variáveis estudadas, condição de processo e tempo de armazenamento.

Durante a oxidação, os ácidos graxos poli-insaturados foram hidrolisados para formar ácidos graxos menores (SABETIAN et al., 2014). Essa ocorrência foi observada também pela correlação negativa entre os ácidos graxos de cadeia longa e os de cadeia curta.

Cada ácido graxo atua em funções importantes no corpo do bebê e mudanças no perfil lipídico podem levar a variações em suas qualidades nutricionais (LIU; LIU; CHEN, 2019). DHA e ARA participam do desenvolvimento dos sistemas cognitivos e visuais. O acúmulo de DHA na membrana lipídica do sistema nervoso central foi observado nos primeiros meses de vida (LAPILLONNE et al., 2013). O ácido palmítico auxilia na absorção de cálcio e outros ácidos graxos, desempenhando um papel na formação dos ossos do recém-nascido e do sistema digestivo (PETIT; SANDOZ; GARCIA-RODENAS, 2017). Assim, de acordo com as necessidades de cada neonato, o conhecimento das variações no perfil lipídico pode auxiliar na melhor prescrição do tipo de leite humano processado atrelado aos tempos de armazenamento caso a amamentação não possa ser realizada.

A diminuição dos níveis de ácidos graxos acarreta perda de nutrientes para os recém-nascidos, principalmente os pré-termo, que apresentam maior demanda por esses nutrientes. Assim, é fundamental observar as necessidades individuais de cada bebê (HE et al., 2016).

As mudanças nos teores de ácidos graxos encontradas neste trabalho são substanciais. Suas médias estão na faixa encontrada na literatura para leite humano cru em vários países do mundo, como Austrália e Camboja (GAO et al., 2018), Coreia do Sul (KIM et al., 2017), Chile (YUHAS; PRAMUK; LIEN, 2006) e China (KIM et al., 2017). Portanto, o leite humano continua sendo uma excelente fonte nutricional de ácidos graxos, mesmo após processamento e armazenamento.

5. CONCLUSÃO

O perfil de ácidos graxos do leite humano foi afetado pelas condições operacionais utilizadas na pasteurização e homogeneização e pelo tempo de armazenamento por até seis meses. A literatura reconhece que o melhor tipo de leite para a nutrição completa do recém-nascido é o leite materno fresco e saudável fornecido pela amamentação direta. No entanto, mesmo após o processamento e armazenamento, o leite humano continua sendo uma excelente fonte nutricional de ácidos graxos, pois a alta qualidade nutricional de seus lipídeos é mantida. Mudanças nas composições lipídicas podem promover variações em suas qualidades nutricionais. Informações sobre essas alterações podem ajudar na rotina dos BLHs a investirem em boas práticas de conservação para a manutenção das características do leite humano doado.

Informações sobre essas alterações podem ajudar a desenvolver fórmulas de acordo com as necessidades de lipídios de cada neonato, caso a amamentação não possa ser adotada. Portanto, a relevância nutricional do leite humano processado viabiliza seu uso.

CAPÍTULO 4 – BENEFICIAMENTO DO LHO NÃO CONFORME PELA PRESENÇA DE SUJIDADES, PARA OBTENÇÃO DE LHO EM PÓ

1. INTRODUÇÃO

O leite humano ordenhado (LHO) é utilizado para promover o bom desenvolvimento do lactente. Contém todos os nutrientes necessários para o seu ganho peso e crescimento saudável. Bebês prematuros e com baixo peso, ou enfermos e que necessitam de internações para seu tratamento após o nascimento podem receber o LHO de unidades de bancos de leite, como aquelas pertencentes à rede global de bancos de leite humano (RGLH). Esta rede atua em diversos países visando, além de outras atividades, o fornecimento de LHO a crianças em tratamento intensivo neonatal para o melhor desenvolvimento delas.

A demanda de LHO nas unidades de terapia intensiva neonatal para atender um segmento de recém-nascidos que possuem requerimentos nutricionais específicos é cada dia maior, em algumas vezes na tentativa de aumentar a velocidade do ganho de peso e encurtar o tempo de internação, alguns profissionais optam pelo uso de aditivos para leite humano.

Tais aditivos disponíveis no mercado atualmente alteram a osmolaridade do produto quando adicionados podendo causar danos na mucosa intestinal destes bebês. Para evitar que os bebês sejam submetidos a estes produtos, este time pensou em desenvolver um processo de beneficiamento do leite não conforme para sujidades em que houvesse a oportunidade de utilizar um volume de leite que seria descartado, e que pudesse ser aproveitado após o beneficiamento, voltado para recém-nascidos prematuros que precisam ganhar peso.

Posto que o LHO é um produto altamente perecível, o seu transporte por longas distâncias ou tempo prolongado, pode ser facilitado com o desenvolvimento de um produto em pó tendo-o como base. Produtos em pó são transportados em maior quantidade e mais facilmente que produtos líquidos. Ademais, pode ser armazenado por um maior período, sendo possível a manutenção de um estoque para épocas de escassez.

Ressalta-se que a retirada da água de um alimento por técnicas de secagem, reduz a atividade de água (A_w) do mesmo, diminui a possibilidade de crescimento de microrganismos (NYHAN et al., 2018), promove um aumento na vida de prateleira do produto, facilita sua estocagem e transporte pela redução de volume. Assim, o desenvolvimento de técnicas de beneficiamento para obtenção de leite humano em pó é justificado, pois ele é necessário para um crescimento e desenvolvimento saudáveis do neonato. Neste contexto é relevante conhecer as alterações que ocorrem no LHO devidas ao processamento para obtenção do produto em pó

e para dimensionar possíveis perdas nutricionais no produto (O'CONNOR; EWASCHUK; UNGER, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Definir uma metodologia para a desidratação/secagem do leite humano a fim de aumentar sua vida útil.

2.2. Objetivos específicos

- Obter leite humano em pó.
- Caracterizar os nutrientes do leite humano em pó antes e após a secagem por dois tratamentos, liofilização e atomização.
- Caracterizar o leite humano em pó quanto aos parâmetros de molhabilidade e dispersibilidade.
- Avaliar o leite humano em termos estruturais por microscopia eletrônica de varredura
- Avaliar as interações entre lipídios e proteínas no leite humano em pó por microscopia confocal.
- Caracterizar os ácidos graxos presentes no leite humano após os processamentos para obtenção do pó.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

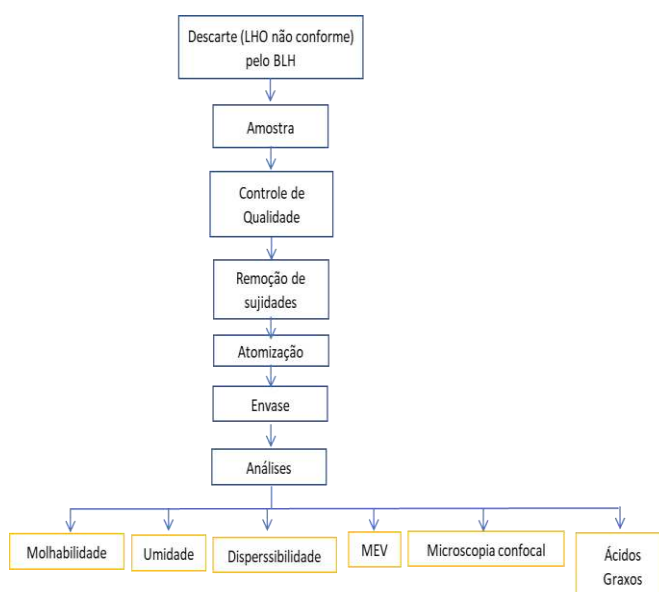
O LHO ao chegar no BLH passou pelo controle de qualidade no BHL, conforme as normas do Manual de Normas Técnicas da Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano. Foi avaliado quanto a presença de sujidades, alterações na cor e cheiro característico, acidez Dornic (não deve ultrapassar 8^oD).

Para o desenvolvimento da metodologia para obtenção do leite humano em pó, foi utilizado LHO não conforme doado pelo BLH do Hospital São Sebastião (HSS), Viçosa, MG, cuja única alteração foi a presença de sujidades físicas observadas nas análises de rotina do BLH, sendo estas removidas por filtração. As amostras de LHO doado pertenciam à fase de

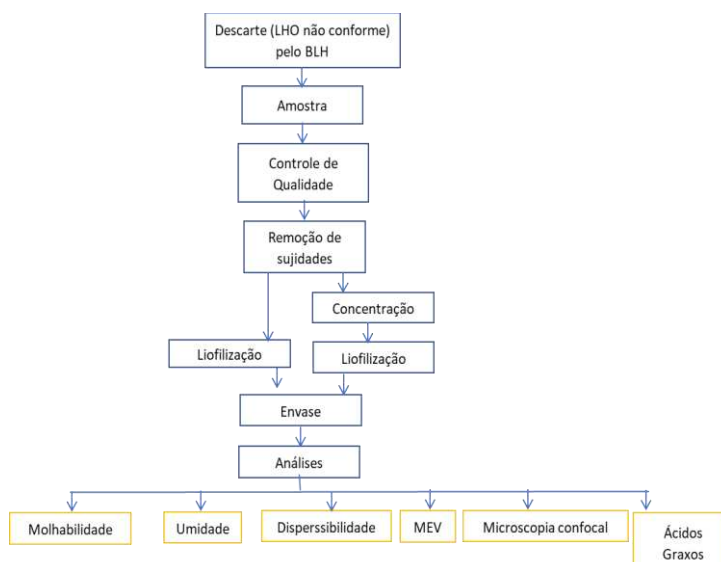
lactação maduro. Foram recolhidas no BLH em caixas térmicas com gelo para a manutenção da temperatura e integridade da amostra e transportadas do BLH ao Laboratório de Operações e Processos da Universidade Federal de Viçosa (LOP/UFV). As amostras obtidas foram então misturadas gerando o leite de mistura, doravante denominado LH.

O LH em pó foi obtido seguindo as etapas metodológicas constantes nos Fluxogramas 2 e 3.

Fluxograma 2 – Desenvolvimento de produto leite humano em pó por secagem por atomização ou spray dryer

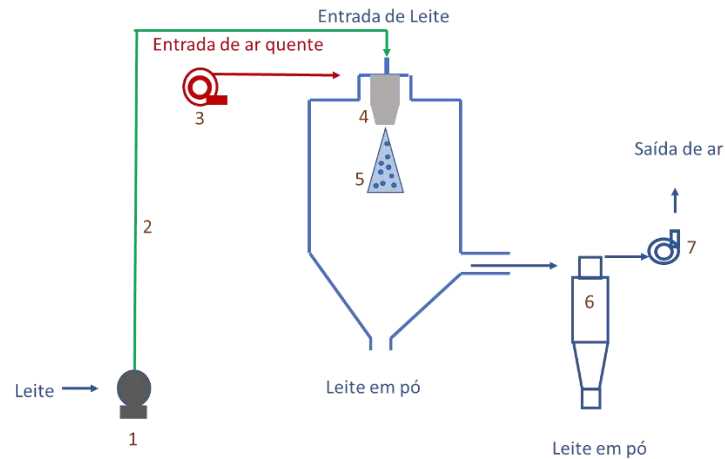


Fluxograma 3 – Desenvolvimento de produto LH em pó por liofilização



A Figura 7 apresenta um diagrama esquemático do atomizador usado nos experimentos.

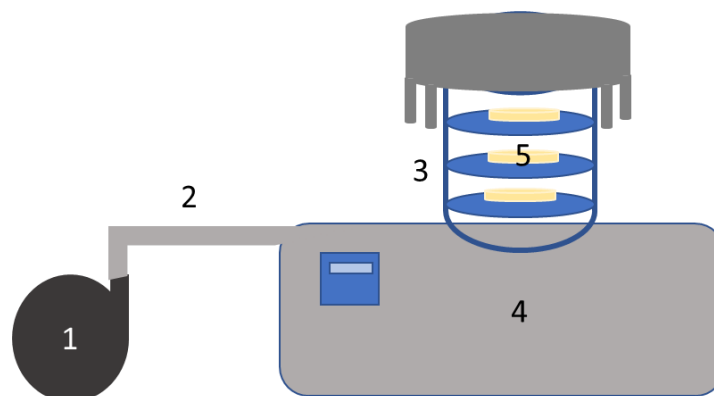
Figura 7 – Esquema de um spray dryer para a produção de leite em pó



1 = Bomba de alimentação; 2 = Circuito de alimentação spray dryer;
3 = Aquecedor de ar; 4 = Bico atomizador; 5 = Câmara de secagem;
6 = Ciclone; 7 = Ventilador de ar de saída.

A Figura 8 apresenta um diagrama esquemático do liofilizador utilizado nos experimentos.

Figura 8 – Esquema de um liofilizador para a produção de leite em pó



1 = bomba de vácuo; 2 = condução de ar para formação de vácuo; 3 = câmara de secagem; 4 = corpo do equipamento contendo compressor para manutenção da temperatura de congelamento (-40°C); 5 = amostra de LH para secagem.

3.1. Metodologias para obtenção do leite humano em pó

3.1.1. Concentração do LH

Para a fabricação do leite em pó, o LHO dos frascos coletados no BHL foi misturado para formar o pool de leite humano (LH). O leite de mistura foi separado em quatro partes, que compuseram os tratamentos:

- LH – Tratamento controle composto de leite de mistura não processado.
- LHSD – Leite humano em pó produzido por spray dryer.
- LHL – Leite humano em pó produzido por liofilização.
- LHEL – Leite humano em pó produzido por evaporação seguida de liofilização.

Previamente à produção do leite humano em pó, foi realizada homogeneização do LHO a 40°C por sonicação (sonicador ultrassônico VCX750, Newtown, EUA) utilizando uma sonda de 13 mm, frequência de 20 kHz, intensidade de 75% por 30 s seguido de pasteurização lenta (62,5°C, 30 min) para eliminação de microrganismos contaminantes. Sendo a pasteurização um procedimento utilizado para todo o leite humano ordenhado, conforme no banco de leite humano.

Foi escolhido para a fabricação do LHO em pó o LHOhp, pois como vimos no capítulo anterior não houve diferenças significativas nas questões nutricionais do LHO entre os tratamentos empregados, e a homogeneização confere para o leite em pó melhores qualidades tecnológicas.

O tratamento LHSD consistiu da secagem do LH por aspersão em aparelho de atomização (BUCHI Mini spray dryer modelo, B-290, Suíça). A temperatura do ar de secagem no spray dryer foi de 160°C e a de saída do pó foi de 65°C, a vazão de LH na entrada foi de 10 mL/min, conforme sugerido por Pearce (2006).

No tratamento LHEL, o LH foi concentrado por evaporação em um evaporador rotativo a vácuo (Fisatom, modelo 802, Brasil), acoplado a banho termostático (Tecnal, TE 184, Brasil) para aquecimento. Para tanto, 200 mL de LH foram alimentados no evaporador e submetidos a um gradiente de temperatura iniciada em 60°C sob pressão negativa (vácuo parcial), sendo a mesma aumentada até 65°C, devido ao aumento da concentração de sólidos. O teor de umidade inicial foi determinado por secagem em estufa de uma alíquota de LH previamente separada. O teor de sólidos foi determinado por balanço de massa considerando o volume inicial de LH e o volume de água coletado no balão coletor do evaporador rotativo. A etapa de evaporação foi finalizada quando o teor de sólidos atingiu 40% (m/m) (BRAGA;

PALHARES, 2007). O LH evaporado foi congelado em ultra freezer (Terroni, Modelo Vertical – 40, Brasil), a -40°C por 24 h, e posteriormente liofilizado (Liofilizador Terroni, Modelo LS3000, Brasil) por 48 h, atingindo o teor de umidade de 4,5%.

No tratamento LHL, o LH foi congelado em ultra freezer (Terroni, Modelo Vertical – 40, Brasil), a -40°C por 24 h, e posteriormente liofilizado (Liofilizador Terroni, modelo LS3000, Brasil) por 48 h, atingindo o teor de umidade de 4,5%.

Após a secagem, o leite em pó obtido em cada tratamentos foi acondicionado em embalagem selada a vácuo, com revestimento de filme laminado para proteção contraluz.

3.1.2. Análise do produto

O leite humano em pó foi caracterizado, antes e após cada tratamento, quanto ao teor de umidade, molhabilidade, dispersibilidade, proteínas, minerais, lipídios, lactose; em termos estruturais do grão por microscopia eletrônica de varredura e em termos das interações entre proteínas e lipídios além de suas estruturas por microscopia confocal.

Para as análises do leite humano em pó que necessitavam de sua reconstituição, ele foi reconstituído utilizando água deionizada, a uma temperatura de 42°C sob agitação até completa solubilização.

3.1.2.1. Determinação dos teores de lactose e de proteínas por cromatografia de íons

Uma alíquota de 1g de LH foi previamente diluído em 50 mL de água destilada e deionizada (Milli Q, Millipore, EUA, resistividade 18 MΩ*cm a 25°C) para uso na quantificação de ambos os constituintes, lactose e proteínas usando o cromatógrafo de íons (CI) (Metrohm, 850 Professional IC, Suíça).

Lactose: Após injeção no módulo de microfiltração e diálise do CI, o material dialisado atravessou uma coluna de troca iônica (Metrohm CARB 2). As interações entre íons presentes na amostra, componentes da coluna e o eluente promovem a separação da lactose dos outros componentes do leite. Um detector amperométrico ao final da linha do aparelho, converte o sinal elétrico correspondente a cada componente em um valor numérico que é transmitido ao software (Metrohm, MagIC Net tm, Suíça) que acompanha o aparelho, gerando a leitura da composição de lactose do leite humano. A comparação entre a leitura da alíquota e a leitura de padrões de lactose (Sigma Aldrich, EUA) previamente lidos em sete concentrações de 0 a 50 ppm permite obter a concentração de lactose da amostra. Para tanto, pode-se usar a

equação de regressão linear obtida pelos dados de concentração do padrão obtidos pela curva analítica (EITH et al., 2006).

Proteínas: Após injeção no módulo de microfiltração do CI, o material atravessou uma coluna SUPERDEX 75. A separação das proteínas dos outros componentes do LH ocorre devido à interação entre os componentes proteicos da amostra com o eluente e por diferença de seus tamanhos. Um detector UV (280 nm) ao final da linha do aparelho, converte o sinal elétrico correspondente a cada componente em um valor numérico que é transmitido ao software (Metrohm, MagIC Net tm, Suíça) que acompanha o aparelho, gerando a leitura da composição das proteínas do leite humano. A comparação entre a leitura da alíquota e a leitura de padrões de Caseína, Lactoferrina, Alfa-Lactoalbumina, IgA e IgG, previamente lidos em sete concentrações de 0 a 50 ppm permite obter a concentração de proteínas da amostra. Para tanto, pode-se usar a equação de regressão linear obtida pelos dados de concentração do padrão obtidos pela curva analítica (EITH et al., 2006).

3.1.2.2. Determinação do teor de umidade

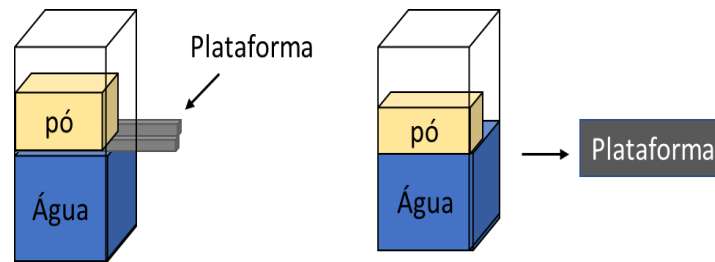
A quantificação de umidade no leite humano é necessária para avaliar a eficiência da secagem e assim garantir uma maior vida de prateleira ao produto. Esta análise foi realizada pelo método gravimétrico de secagem em estufa a 105°C com secagem da amostra até peso constante, seguido as normas analíticas do Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008).

3.1.2.3. Determinação do teor de molhabilidade (higroscopicidade) leite humano em pó

A molhabilidade, ou higroscopicidade, é a capacidade das partículas de adsorverem a água. Esta condição está relacionada ao teor de gordura livre no alimento, temperatura da água de reconstituição, tamanho e forma da partícula (VISSOTTO et al., 2006).

A análise de molhabilidade estática foi realizada de acordo com o método descrito por Freudig, Hoge Kamp e Schubert (1999), no qual 1g de leite humano em pó é colocado em uma plataforma deslizante acoplada em um cubo de vidro contendo 100 mL de água deionizada. Ao se deslizar rapidamente a plataforma para fora do cubo todo o conteúdo de pó cai sobre a água ao mesmo tempo, momento exato em que se inicia a contagem do tempo por cronômetro. A água é transferida por capilaridade para o pó até que toda a massa de pó fique molhada. Nesse momento a contagem é interrompida, obtendo-se o tempo de molhabilidade como mostrado na Figura 9.

Figura 9 – Arranjo para análise de molhabilidade



3.1.2.4. Determinação da solubilidade do leite humano em pó

A análise de solubilidade consiste na avaliação da capacidade do leite em pó de se dispersar em água, sendo realizada pela reconstituição da amostra em água com posterior separação. Calcula-se então a quantidade de matéria seca no sistema reconstituído e, conseqüentemente, a umidade do sobrenadante (CANO-CHAUCA et al., 2005).

A análise de solubilidade foi conduzida utilizando a metodologia descrita por Eastman e Moore (1984) e modificada por Cano-Chauca et al. (2005). Para tanto, 1 g de leite humano em pó foi adicionado cuidadosamente em béquer de 250 mL contendo 100 mL de água deionizada em agitador rotativo (IKA, RW20, Alemanha), mantido sob agitação a 300 RPM por 5 min. Após a agitação as dispersões foram transferidas para tubos tipo Falcon (50 mL) e centrifugadas (Eppendorf, Centrifuge 5430, Alemanha) a 3.000 g por 5 min. Após centrifugação, uma alíquota de 25 mL do sobrenadante foi coletada e transferida para placas de Petri previamente secas e pesadas. As placas foram levadas para secagem em estufa a 105°C até peso constante. A solubilidade foi calculada a partir do peso final do pó presente na placa que foi obtido por diferença entre o peso inicial da alíquota úmida e aquela seca na placa.

3.1.2.5. Análise de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (LEO, 1430VP acoplado a sonda de raio-X (EDS), Alemanha) foi realizada para observar a estrutura superficial do leite humano em pó. As análises de MEV foram realizadas com o leite humano em pó obtido pelos tratamentos por spray dryer (LHSD), Liofilização (LHL) e evaporação seguida de liofilização (LHEL).

A análise de microscopia confocal de varredura a laser (ZEISS, LSM510 META, Alemanha) foi realizada com finalidade de observar as interações e agregações de componentes do leite (proteínas com gorduras) que ocorrem durante a secagem deste. A interação ocorreu entre as proteínas do leite humano em pó com o fluoróforo fast green e dos lipídios com o fluoróforo vermelho do Nilo. As análises de microscopia confocal foram realizadas com os leites LHSD, LHL e LHEL, reconstituídos ao teor de sólidos original.

3.1.2.6. Análise do teor de ácidos graxos

Extração dos lipídios

A metodologia de extração de lipídios foi adaptada de Bligh e Dyer (1959). O leite foi descongelado a 40°C em banho termostático (Tecnal, Brasil), e uma massa de 0,5 g foi pesada em balança analítica (Shimadzu, Japão). O volume de 3 mL de uma mistura de metanol: clorofórmio de 2:1 foi adicionado ao sistema de extração de lipídios. A mistura foi mantida sob agitação em mesa agitadora (Tecnal, Brasil) por 30 min., seguida da adição de 1 mL de clorofórmio e 1,8 mL de solução salina (0,9 g/mL de NaCl). Após a divisão das três fases, o fundo (~ 2 mL) foi pipetado, seco (45°C) em banho seco (Labnet, EUA) e a massa de lipídios determinada por gravimetria. Os resultados revelaram uma média de 15 mg de lipídios por amostra. As fases superior e intermediária foram descartadas em frascos apropriados.

Derivatização

A amostra para a caracterização de ácidos graxos foi preparada pelo método de transesterificação direta que foi adaptado da metodologia descrita por Martinez et al. (2012), na qual foi adicionada em um frasco de derivatização 100 microlitros de um padrão de C11 como padrão interno, em solução de 10 mg/ml em hexano, então evaporado o hexano e posteriormente adicionado 15 mg de óleo, adicionar 1 ml de solução de KOH 1M em etanol 70%, tendo sido mantidos os frascos em banho seco por 1 hora para saponificação a uma rotação de 200 rpm em mesa agitadora (Marconi, MA 140/CF). Posteriormente, foram adicionados 300 µl de HCl 8M. Adicionou-se 2 ml de hexano e 1 ml de solução de NaCl a 0,9% (m/v), levou-se a aparelho de vortex e posteriormente foi deixado sob repouso para separação de fases. Foi pipetado 1 ml do sobrenadante para outro frasco e realizada lavagem da amostra com 1 ml de hexano por cinco vezes. Secou-se a amostra em estufa a 65°C para remoção do hexano. Foram adicionados 2 ml de H₂SO₄ 2% (v/v) em metanol e levados em banho seco a 90°C por 90 minutos. Após este procedimento, foi adicionado 1 ml de solução de NaCl 0,9% (m/v) e 2 ml de hexano. Coletou-

se 1 ml do sobrenadante o qual foi transferido para um frasco ependorf contendo 0,1 g de sulfato de sódio anidro. Procedeu-se agitação em vortex (Phoenix Lufenco, Brasil) por um minuto, posteriormente foi realizada uma centrifugação a 2.800 RCF por 15 minutos (Eppendorf, Alemanha) e coletou-se 500 microlitros do sobrenadante ao qual foi adicionado 500 microlitros de hexano em frasco vial apropriado e posteriormente levado ao Cromatógrafo Gasoso (Shimadzu, GC-2010, Japão) usando uma coluna capilar de 100 m x 0,25 mm (SP-2560, Sigma Aldrich, EUA), para que fosse realizada a caracterização dos ácidos graxos.

Os ácidos graxos foram identificados por meio dos tempos de retenção dos FAMEs da amostra comparados aos tempos de retenção da mistura padrão FAME (Supelco, 37 componentes FAMEs Mix, Sigma Aldrich, EUA). Três repetições foram realizadas para a análise de cada amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 10 mostra os três tipos de leites em pó obtidos nos diferentes tratamentos desta pesquisa.

Figura 10 – Leites em pó obtidos nos diferentes tratamentos



4.1. Caracterização centesimal do leite humano em pó

O processamento do leite humano pode causar alterações nos nutrientes e na sua capacidade bioativa (O'CONNOR; EWASCHUK; UNGER, 2015), devido a desnaturação de

proteínas e oxidação de ácidos graxos, por exemplo. Por este motivo é importante conhecer as alterações causadas nos constituintes do LH devido às operações de secagem.

A Tabela 9 reflete a análise nutricional do leite humano processado por secagem e indica que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre a composição dos três tipos de leite em pó obtidos nos tratamentos empregados, ou seja, LHSD, LHEL e LHL, na maior parte de seus constituintes nutricionais.

Apenas o conteúdo de lactose apresentou alteração estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) quando leite em pó reconstituído é comparada com o leite fluido, como pode ser visto na Tabela 9.

Tabela 9 – Macro e micronutrientes do leite humano fluido e desidratado

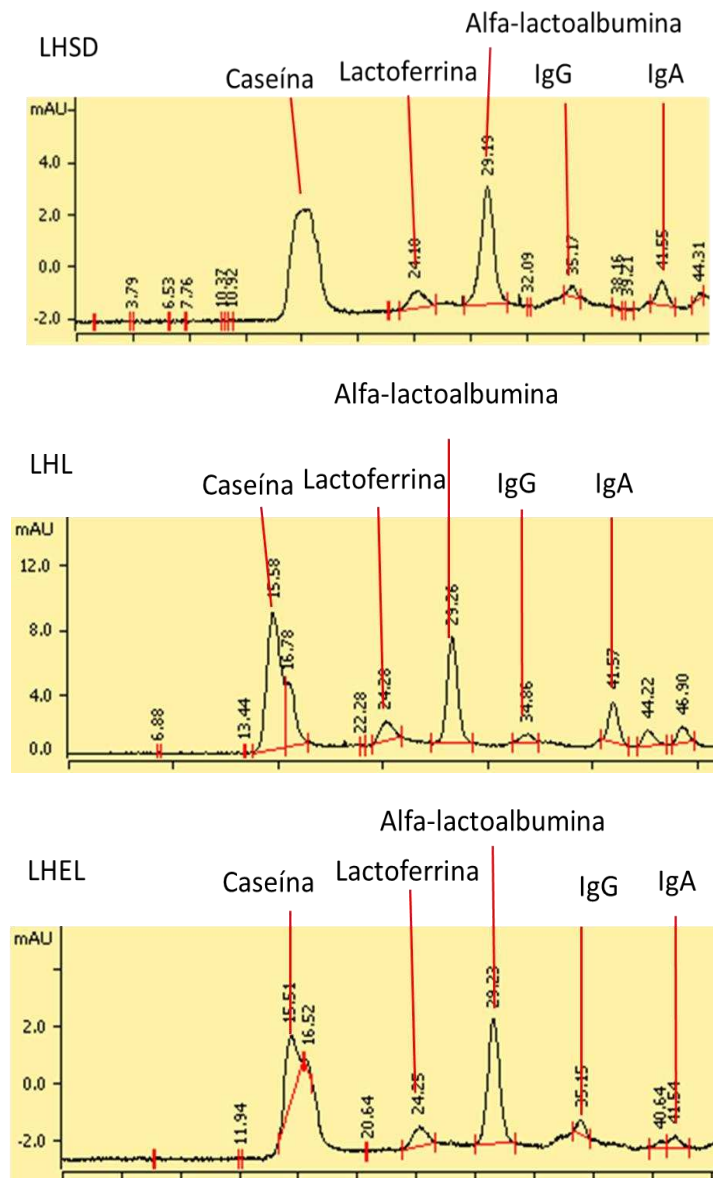
Compostos	LHF ± sd	LHSD ± sd	LHL ± sd	LHEL ± sd
Umidade*	88,33 ± 0,163	4,69 ± 0,026	4,96 ± 0,016	4,7 ± 0,012
Lipídios*	3,29 ± 0,039	26,82 ± 0,04	26,78 ± 0,031	26,83 ± 0,046
Proteínas*	1,1 ± 0,076	8,96 ± 0,016	8,99 ± 0,028	8,94 ± 0,024
Lactose* (leite em pó reconstituído)	6,46a ± 0,14	6,15bc ± 0,11	6,27ab ± 0,099	6,02c ± 0,094
Lactose por diferença	6,94 ± 0,14	57,13 ± 0,14	57,36 ± 0,13	57,34 ± 0,11
Cinzas*	0,25 ± 0,015	2,04 ± 0,12	2,07 ± 0,13	2,01 ± 0,11
Na**	20,32 ± 2,01	164,7 ± 15,62	165,3 ± 20,59	163,5 ± 11,68
Mg**	2,15 ± 0,12	16,94 ± 1,03	16,96 ± 1,06	16,26 ± 0,61
P**	9,18 ± 0,97	74,29 ± 7,89	74,47 ± 6,66	73,01 ± 8,92
K**	33,81 ± 2,61	283,6 ± 21,26	286,5 ± 23,35	281,8 ± 18,22
Ca**	20,01 ± 0,52	161,7 ± 2,75	162,4 ± 4,71	161,4 ± 4,80
Fe**	0,025 ± 0,014	0,22 ± 0,12	0,23 ± 0,01	0,16 ± 0,11
Zn**	0,5 ± 0,056	4,03 ± 0,47	4,12 ± 0,38	3,83 ± 0,43

LHF = Leite humano fluido; LHSD = Leite humano spray dryer; LHL = Leite humano liofilizado; LHEL = Leite humano evaporado liofilizado; sd = Desvio Padrão; * = g/100 mL; ** = mg/100 mL.

4.2. Proteínas

A Figura 11 mostra as proteínas do leite humano em pó identificadas por cromatografia de exclusão molecular; são elas a caseína, lactoferrina, α -lactoalbumina, IgG e IgA.

Figura 11 – Cromatograma das proteínas do leite humano em pó LHSD, LHL e LHEL (cromatografia de exclusão molecular com coluna SUPERDEX 75)



Apesar de apresentar leves variações numéricas, apenas a proteína IgA sofreu alterações significativas ($p \leq 0,05$), devido aos tratamentos de secagem do leite quando comparados ao leite humano cru (nenhum tratamento prévio) como observado na Tabela 10.

Tabela 10 – Teor de proteínas do leite humano cru e em pó

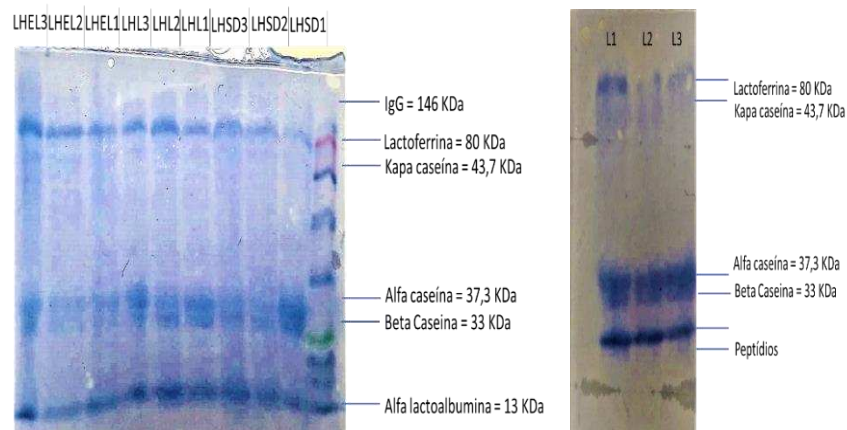
Proteínas	LHC ± sd	LHSD ± sd	LHL ± sd	LHEL ± sd
Caseína*	1,6 ± 0,082	1,47 ± 0,12	1,5 ± 0,08	1,43 ± 0,08
Lactoferrina*	2,5 ± 0,24	2,43 ± 0,21	2,45 ± 0,21	2,38 ± 0,22
Alfa- Lactoalbumina*	2,98 ± 0,26	2,75 ± 0,18	2,85 ± 0,23	2,66 ± 0,16
IgG**	29,8 ± 2,69	28,85 ± 3,63	28,52 ± 3,04	27,63 ± 2,59
IgA**	146,97 a ± 1,07	120,13 c ± 1,35	127,1 b ± 1,42	117,13 c ± 1,39

sd = Desvio Padrão; * mg/mL; ** µg/mL; LHC = Leite humano cru; LHSD = Leite humano spray dryer; LHL = Leite humano liofilizado; LHEL = Leite humano evaporado liofilizado; Letras seguidas aos dados demonstram diferença significativa a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

A IgA exibiu redução em sua concentração no leite humano em pó devido aos tratamentos de secagem. O tratamento LHEL apresentou os menores teores (117,13 µg/mL) não sendo diferente significativamente do LHSD (120,13 µg/mL), seguidos de LHL (127,1 µg/mL). A maior concentração foi para o LH cru (146,97 µg/mL).

A análise de eletroforese realizada no leite humano desidratado, assim como no leite humano fluido (Figura 12) demonstra a presença de α -Lactoalbumina, β -Caseína, α -Caseína, κ -Caseína e Lactoferrina. Diferentemente do leite humano fluido, no leite humano desidratado não foi possível identificar por eletroforese peptídios menores.

Figura 12 – Perfis proteicos SDS PAGE (30% T e 2,7 % C): gel de concentração de 4,5% e gel de separação de 14%. Pool de leite humano na fase maduro, com 20 µg



Canaleta 1: padrão de massa molecular; LHSD = Leite humano spray dryer; LHL = Leite humano liofilizado; LHEL = Leite humano evaporado liofilizado; L1 = Leite humano cru; L2 = Leite humano pasteurizado; L3 = Leite humano homogeneizado pasteurizado.

Nota-se que no LHL a região das bandas da IgG se apresenta também mais visível, com bandas mais espessas, enquanto nos outros tratamentos praticamente nem são notadas. A espessura das bandas para o LHEL se apresenta delgada em todas as proteínas, o que demonstra uma possível redução em suas concentrações. Fato este que pode ser corroborado com os valores apresentados na Tabela 10.

Apesar da não identificação da IgA por eletroforese, pode-se verificar sua presença no leite humano desidratado pela cromatografia por exclusão molecular, como visto na Figura 12 e na Tabela 10.

Observando que as alterações causadas nas proteínas pelos tratamentos empregados para obtenção do leite humano em pó foram mínimas, havendo diferenças significativas ($p \leq 0,05$) apenas para a IgA, pode-se considerar que os benefícios relacionados ao armazenamento de leite humano em pó quando comparado ao in natura superam estas perdas mínimas.

4.3. Lipídios

Dados da Tabela 9 mostram que o teor de lipídios não se alterou estatisticamente após os tratamentos de secagem para obtenção do leite humano em pó.

4.4. Ácidos graxos

A Tabela 11 mostra a composição dos ácidos graxos presentes no leite humano fluido (sem tratamento) e nos leites dos tratamentos empregados na obtenção do leite humano em pó.

Na Tabela 11, observa-se que os tratamentos de desidratação do leite humano por spray dryer, liofilização e evaporação seguida de liofilização, não ocasionaram alterações significativas ($p \leq 0,05$) na maior parte das concentrações dos ácidos graxos do leite humano. Entretanto os tratamentos de secagem ocasionaram uma redução de aproximadamente 30% do DHA em relação ao leite humano fluido (sem processamento), não havendo diferença estatística entre os tratamentos.

Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) foram observadas nas concentrações dos ácidos docosadienóico e láurico para o LHSD; ácidos tricosanóico e erúxico para o LHSD e LHEL; Cis-10-Heptadecanóico para o LHEL. O ácido caprílico apresentou maior concentração no LHEL e menor no LHSD.

Tabela 11 – Composição de ácidos graxos do leite humano desidratado por spray dryer e liofilização

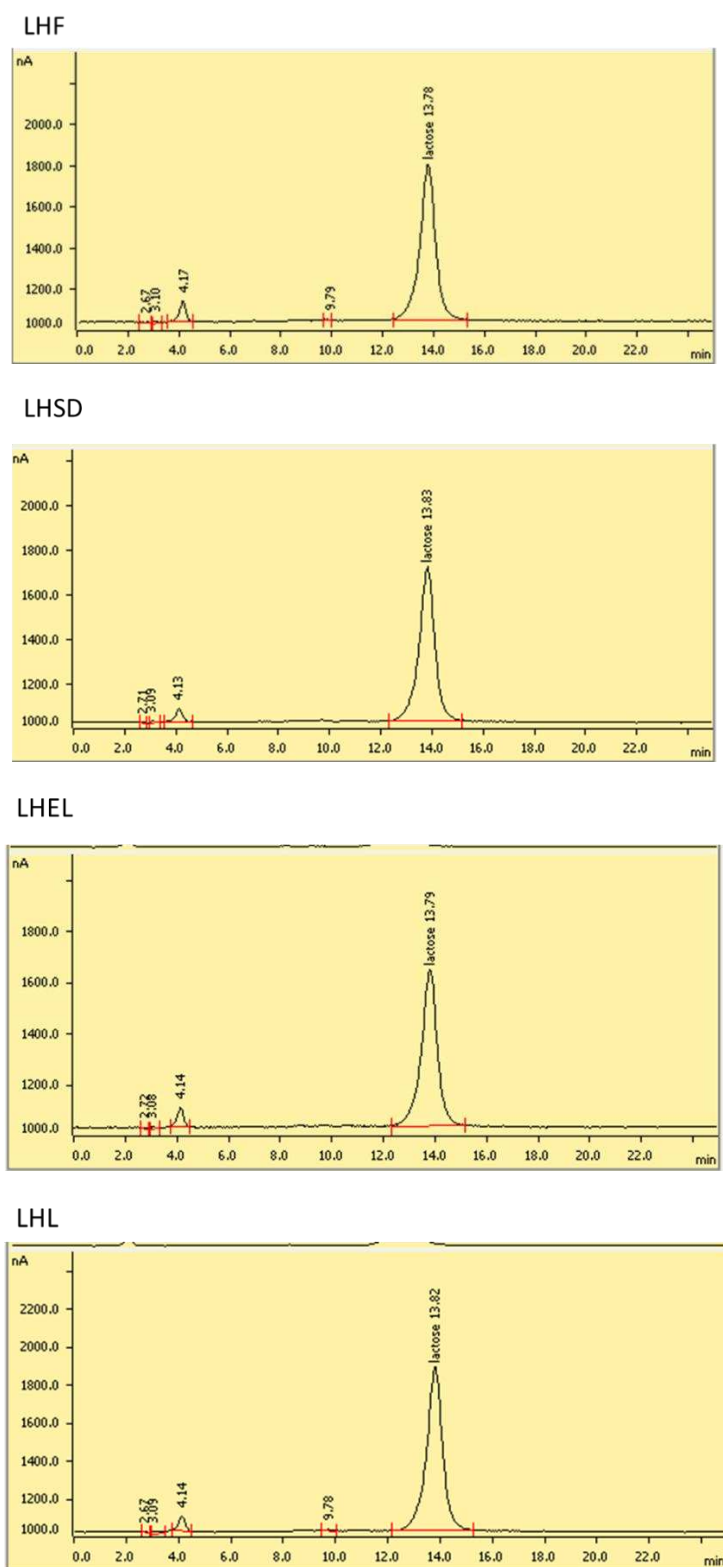
Composto	LHF ± sd	LHSD ± sd	LHEL ± sd	LHL ± sd
C8:0	0,04b ± 0.003	0.03c ± 0.005	0.05a ± 0.001	0.04b ± 0.001
C10:0	0,74 ± 0.04	0.75 ± 0.03	0.73 ± 0.03	0.73 ± 0.015
C12:0	5.18a ± 0.22	4.25b ± 0.14	5.11a ± 0.13	5.16a ± 0.3
C14:0	6.93 ± 0.98	5.29 ± 0.26	7.31 ± 1.04	7.49 ± 1.19
C14:1	0.06 ± 0.007	0.06 ± 0.004	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.002
C15:0	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.24 ± 0.03	0.21 ± 0.014
C15:1	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.22 ± 0.01
C16:0	20.9 ± 0.93	20.5 ± 0.75	21.3 ± 0.43	19.9 ± 0.97
C16:1	2.51 ± 0.19	2.68 ± 0.03	2.18 ± 0.14	2.27 ± 0.26
C17	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.23 ± 0.01
C17:1	0.23a ± 0.01	0.24a ± 0.002	0.18b ± 0.01	0.23a ± 0.015
C18:0	6.28 ± 0.37	6.05 ± 0.42	6.49 ± 0.04	6.03 ± 0.31
C18:1n9c	34.8 ± 0.63	34.1 ± 1.18	33.1 ± 0.55	34.3 ± 0.32
C18:1n9t	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.003	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
C18:2n6c	16.5 ± 0.58	16.1 ± 0.17	16.2 ± 0.78	16.9 ± 0.39
C20:0	0.12 ± 0.009	0.12 ± 0.007	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.004
C18:3n6c	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.005	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.009
C18:3n3	1.53 ± 0.03	1.48 ± 0.04	1.48 ± 0.02	1.64 ± 0.2
C21:0	0.06 ± 0.008	0.06 ± 0.002	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.002
C20:2	0.35 ± 0.034	0.31 ± 0.004	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.018
C22:0	0.38 ± 0.01	0.34 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.011
C20:3n6	0.59 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.54 ± 0.03	0.58 ± 0.023
C22:1n9	0.07a ± 0.005	0.04b ± 0.002	0.04b ± 0.006	0.07a ± 0.003
C23:0	0.03a ± 0.002	0.02b ± 0.002	0.02b ± 0.002	0.03a ± 0.003
C20:4n6	0.41 ± 0.09	0.37 ± 0.07	0.37 ± 0.03	0.46 ± 0.089
C22:2	0.04a ± 0.006	0.03b ± 0.004	0.04a ± 0.004	0.04a ± 0.002
C24:0	0.03 ± 0.007	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.003	0.04 ± 0.002
C20:5n3	0.09 ± 0.006	0.09 ± 0.001	0.09 ± 0.004	0.09 ± 0.005
C24:1n9	0.06 ± 0.004	0.05 ± 0.001	0.05 ± 0.005	0.06 ± 0.01
C22:6n3	0.76a ± 0.02	0.56b ± 0.03	0.54b ± 0.01	0.55b ± 0.027

Letras posteriores aos dados indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey; resultados sem letras posteriores indicam que não houve diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos; sd = desvio padrão; LHF = Leite humano fluido; LHSD = Leite humano spray dryer; LHEL = Leite humano evaporado liofilizado; LHL = Leite humano liofilizado.

4.5. Lactose

A Figura 13 mostra que os teores de lactose apresentaram diferenças significativas (p -valor de 0,0012) entre os tratamentos revelando que os tratamentos para a obtenção do leite em pó modificam a concentração da lactose no leite humano.

Figura 13 – Análise cromatográfica da lactose no leite humano fluido e no leite humano em pó (cromatografia de íons com coluna CARB 2)

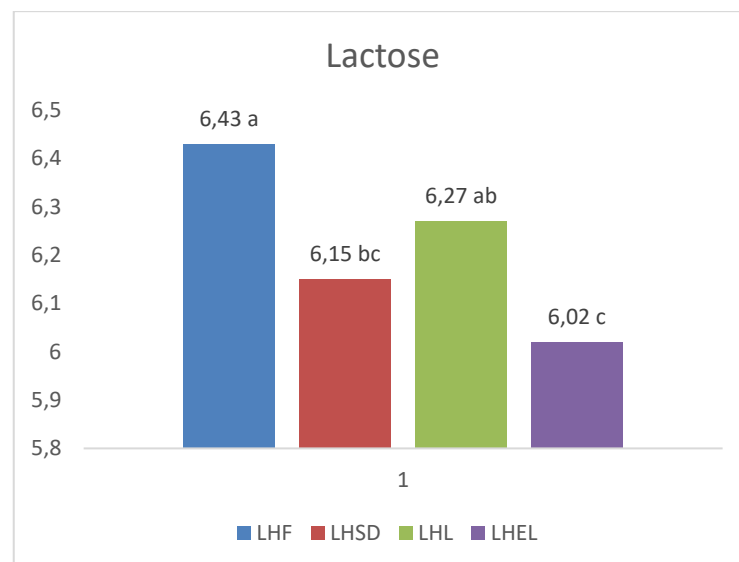


O tratamento LHEL apresentou maior diferença estatística para a lactose em relação ao LHF, que pode ser oriunda do longo tempo de exposição do LHEL ao tratamento térmico, já que passou por dois tratamentos (evaporação e liofilização).

O tratamento LHL não apresentou diferença significativa ($p \geq 0,05$) para a lactose quando comparado ao LHF, pois foi exposto a um tratamento com elevação de temperatura reduzida na liofilização.

Na Figura 14, observam-se variações dos teores de lactose entre os tratamentos para obtenção do leite em pó. A redução nos teores de lactose é maior no leite humano submetido a processamentos térmicos mais intensos.

Figura 14 – Teores de lactose do leite humano em pó comparado ao leite humano fluido não processado. Letras seguidas dos dados indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey



4.6. Qualidade do pó

A desidratação por spray dryer é uma maneira prática de se obter um alimento em pó sem que haja perda drástica na qualidade do produto e em seus constituintes, devido a um baixo tempo de exposição ao calor no aparelho e moderada elevação de temperatura do pó (BRAGA; ROCHA; HUBINGER, 2018).

O leite em pó é um alimento complexo cuja qualidade depende do tamanho do grão formado, da formação de aglomerações, do teor de lipídios (BIRCHAL et al., 2005) e da capacidade de reconstituição (LEE et al., 2014). Esta capacidade está intrinsecamente ligada a

algumas propriedades do leite em pó, como: densidade aparente, dispersibilidade ou solubilidade e molhabilidade.

Algumas dessas propriedades do leite humano obtidas no presente trabalho estão listadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Propriedades do leite humano em pó

Propriedades	LHSD	± sd	LHEL	± sd	LHL	± sd
Densidade aparente (kg/m ³)	468	± 17,2	481	± 15,7	442	± 27,1
Dispersibilidade (%)	78,93 b	± 0,95	81 a	± 0,515	77,1 c	± 1,199
Molhabilidade (s)	324,25 b	± 4,82	296,5 c	± 6,42	349 a	± 4,95

LHSD = Leite humano spray dryer; LHEL = Leite humano evaporado liofilizado; LHL Leite humano liofilizado; letras seguidas dos dados indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas ($p \geq 0,05$), para a densidade aparente do pó. Os valores relatados de densidade para leite de vaca em pó normalmente se encontram entre 380 e 750 kg/m³ dependendo do tipo do pó e de seu grau de compactabilidade (ENRÍQUEZ-FERNÁNDEZ; CAMARILLO-ROJAS; VÉLEZ-RUIZ, 2013).

Maiores valores de densidade podem favorecer também a uma melhor reconstituição ao permitir que o grão submerja mais facilmente na água, com isso aumenta-se a molhabilidade do grão (FREUDIG; HOGKAMP; SCHUBERT, 1999), fator este que pode ser observado na Tabela 12.

Para a dispersibilidade foram verificadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre todos os tratamentos. A maior dispersibilidade no LHEL indica sua maior capacidade reconstituente, e resulta em menor perda de massa durante a reconstituição. A dispersibilidade do leite em pó é influenciada pela presença de lipídios, pois os lipídios durante o processo de secagem migram para a superfície do grão dificultando sua solubilização devido às suas propriedades hidrofóbicas (PETIT et al., 2017). Sendo assim o ideal para a fabricação de um leite em pó de maior qualidade para reconstituição, é a partir de um leite desnatado (VIGNOLLES et al., 2009),

Entretanto, não é viável retirar a gordura do leite humano para a produção do leite humano em pó devido à indiscutível importância dessa no crescimento e desenvolvimento do neonato.

A dispersibilidade é também afetada por danos causado às proteínas pelo tratamento de secagem, o que leva a uma redução da capacidade de reconstituição do leite em pó (ROGERS et al., 2012).

Já para a molhabilidade, todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$), sendo que o LHL apresentou maior tempo para que a água penetrasse em toda a massa de pó, enquanto o LHEL apresentou menor tempo. Um tempo maior para que a água penetre na massa de pó indica uma menor capacidade reconstituente, por impor maior resistência à penetração e interação com a água.

A ocorrência de aglomerações nos grãos de leite em pó pode auxiliar na reconstituição pelo fato da água se deslocar pelos poros dos aglomerados facilitando a molhabilidade. Este deslocamento da água é mais fácil do que apenas pelos poros capilares internos dos grãos (BIRCHAL et al., 2005).

As indústrias utilizam compostos surfactantes como óleo de lecitina ou carboidrato amorfo como forma de melhorar a capacidade de reconstituição do leite em pó (CHEVER et al., 2017), entretanto isto não é possível no leite humano em pó, pois isto incluiria na alimentação compostos diferentes ao leite humano.

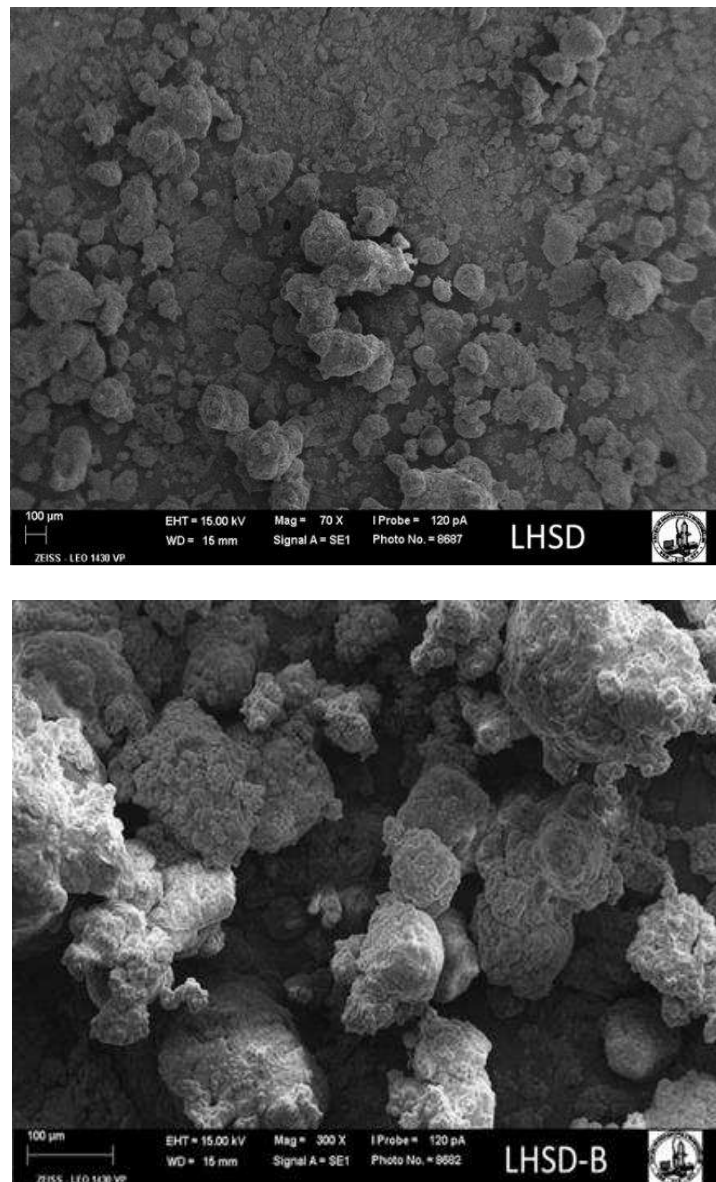
4.7. Microscopia eletrônica de varredura

Cada tratamento de secagem empregado neste estudo apresenta características diferenciadas, ocasionando na obtenção de diferentes tipos de leite em pó. Pode-se observar as diferenças na estrutura dos grãos do leite humano em pó obtidos de cada tratamento pelas imagens obtidas das micrografias (Figuras 15 a 21).

Durante a secagem do leite por spray dryer ocorre a migração de lipídios e proteínas para o exterior da gotícula enquanto compostos mais hidrofílicos como minerais e lactose migram para o interior do grão. Um maior teor de lipídios no leite, resultará em dificuldades na reconstituição do leite (BIRCHAL et al., 2005).

A presença de rugosidades na superfície do grão do leite em pó ocorre quando se tem muitas partículas de lipídios e proteínas que migraram para a superfície do grão durante a secagem. A adsorção de partículas de proteínas aos lipídios, ocorre na secagem por spray dryer, de forma semelhante mas em menor concentração que a ocorrida durante o processo de homogeneização industrial do leite bovino, devido à alta velocidade em que ocorre a secagem (VIGNOLLES et al., 2009).

Figura 15 – Micrografia leite humano em pó



LHSD e LHSD-A = Aumento de 70x; LHSD-B = Aumento 300x.

Na micrografia do LHSD observam-se as deposições proteicas pela rugosidade, com tamanhos aproximadamente uniformes de área média de aproximadamente 100 μm , com conformação esférica.

Diâmetros médios do grão de leite em pó normalmente vistos na literatura para leite em pó bovino obtidos por spray dryer são em torno de 100 a 350 μm (BIRCHAL et al., 2005; ROGERS et al., 2012; ENRÍQUEZ-FERNÁNDEZ; CAMARILLO-ROJAS; VÉLEZ-RUIZ,

2013). Os diâmetros médios dos grãos do LHSD (93,25 μm) foram menores do que os obtidos no LHL (151,47 μm) e próximos aos do LHEL (99,19 μm).

Algumas aglomerações de grãos foram observadas no LHSD sendo este comportamento comum no leite em pó bovino obtido por spray dryer. As aglomerações no leite em pó pode ocorrer devido a atuação das forças de van der Waals e ligações dipolo, sendo os aglomerados menos densos (BIRCHAL et al., 2005).

A presença de aglomerados no leite em pó influencia na densidade e melhora a capacidade reconstituente do leite em pó ao favorecer a imersibilidade do pó em água (CHEVER et al., 2017).

A liofilização não utiliza elevação de temperatura portanto é uma secagem a frio com a utilização da redução de pressão. Não promove perdas nutricionais por atuação térmica e representa uma opção viável para a manutenção dos nutrientes do leite humano (SALCEDO et al., 2015).

Tratamentos de secagem por liofilização consistem na remoção da água de um sistema congelado. Assim, para o caso em estudo, microporos serão formados no leite humano desidratado e a migração de constituintes do leite para a superfície será menor (ZHOU et al., 2016). Entretanto o leite em pó por liofilização não apresentou uniformidade dos grãos como visto na Figura 16. Foi formada uma massa compacta e foi necessário aplicar um processamento adicional de moagem para tentar obter um pó mais homogêneo. Entretanto, a moagem forneceu um pó com grãos heterogêneos, sem forma estrutural definida e de diâmetro maior. Estas características acarretam maiores dificuldades na solubilização devido a menores superfícies de contato com o líquido.

A microscopia do grão de LHL aumentada 300X mostra a existência de pequenos poros, formados durante a migração da água por sublimação.

A porosidade no grão pode favorecer a reconstituição do leite, pois permite a entrada de água no interior do grão, o que conseqüentemente aumenta a superfície de contato da água com o grão (ZHOU et al., 2016). Entretanto esta melhoria na reconstituição pode não ser suficiente quando comparada a um diâmetro do grão muito elevado.

Figura 16 – Micrografia leite humano em pó



LHL e LHL-A = Aumento de 70x; LHL-B = Aumento 300x.

O LHEL apresentou maior rugosidade em sua superfície como visto na Figura 17. Provavelmente houve interação entre os constituintes sólidos durante a evaporação do leite (ENRÍQUEZ-FERNÁNDEZ; CAMARILLO-ROJAS; VÉLEZ-RUIZ, 2013).

Figura 17 – Micrografia leite humano em pó

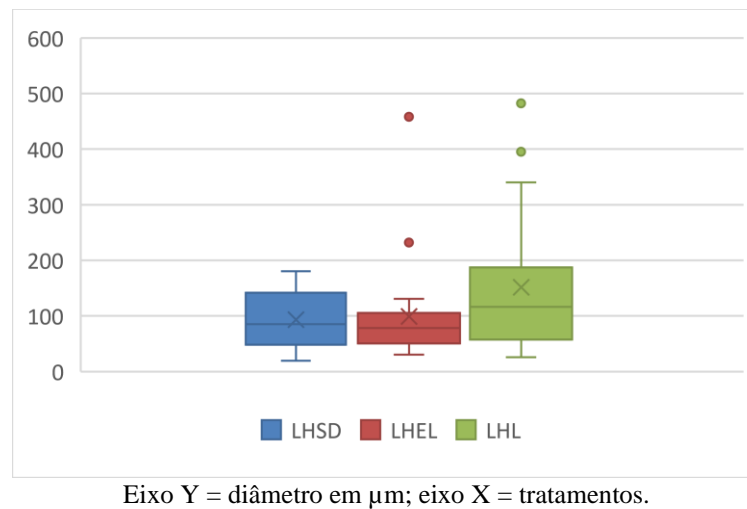


LHLE e LHLE-A = Aumento de 70x; LHLE-B = Aumento 300x.

Assim como para o LHL, o LHEL continha pequenos poros (Figura 17 LHL-B), pois também foi liofilizado.

A Figura 17 mostra a distribuição do diâmetro do grão obtido na produção dos três tipos de leite humano em pó. O tratamento LHEL revelou uma maior concentração de grãos de diâmetro próximo a 100 µm, com ponto central ($78,23 \pm 90,98 \mu\text{m}$) menor que o do tratamento LHSD ($85,48 \pm 48,68 \mu\text{m}$). Entretanto apresentou heterogeneidade nos grãos, sendo verificada uma média ($99,19 \pm 90,98 \mu\text{m}$) com pontos fora da média ($232,25 \mu\text{m}$; $458,06 \mu\text{m}$).

Figura 18 – Distribuição do diâmetro do grão dos tratamentos para obtenção do leite em pó



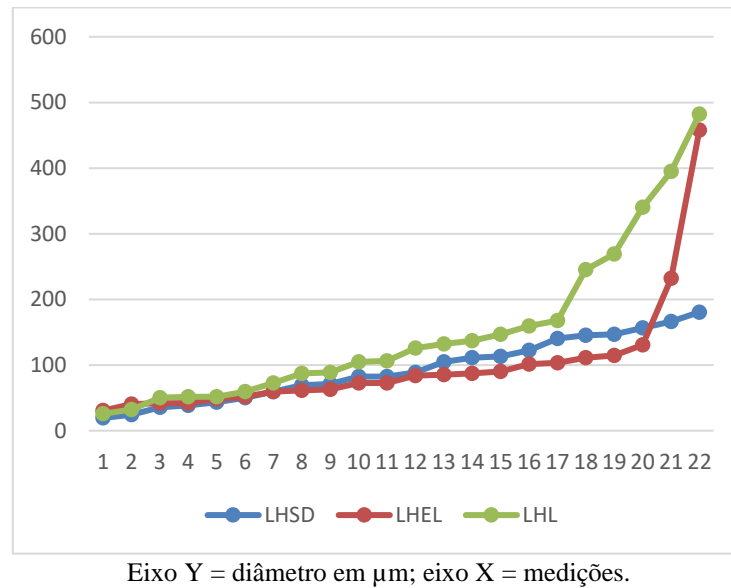
Os grãos de leite em pó obtidos pelo tratamento LHSD apresentaram maior homogeneidade na distribuição de diâmetro, com média ($93,26 \pm 48,68 \mu\text{m}$) próxima ao ponto central ($85,48 \mu\text{m}$), o que é esperado pela maneira como ocorre a secagem por spray dryer, a qual são formadas gotículas pelo bico atomizador, as quais possuem praticamente o mesmo diâmetro.

No tratamento LHL verifica-se que os diâmetros dos grãos são maiores, com média ($151,47 \pm 122,65 \mu\text{m}$) acima da média dos outros tratamentos e pontos fora da média ($482,26 \mu\text{m}$).

A Figura 19 mostra que os três tratamentos para obtenção do leite pó possuem alguns grãos de diâmetro semelhantes, entretanto os tratamentos LHL e LHEL produziram grãos muito extremamente heterogêneos, apresentando-se muito diferente da média geral e possuindo desvios padrões muito altos ($122,65$ e $90,98$ respectivamente).

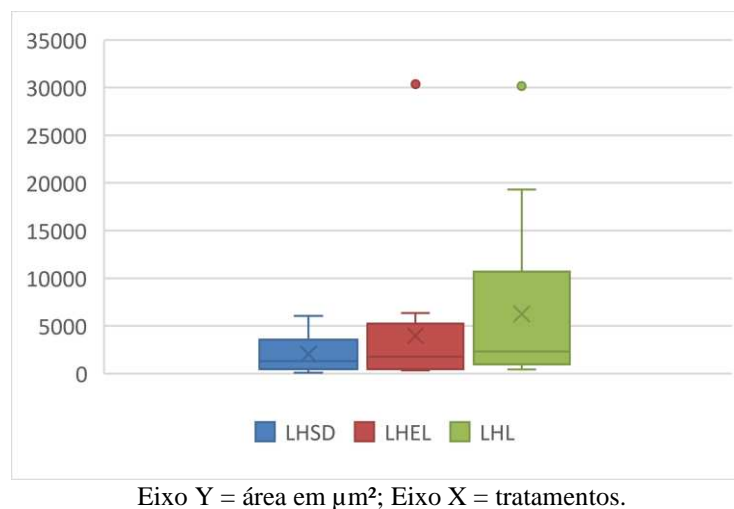
Rogers et al. (2012) reportaram a média de diâmetros dos grãos leite bovino em pó na faixa entre 40 e $300 \mu\text{m}$, dependendo do tipo de pó.

Figura 19 – Diâmetros do leite humano em pó obtidos pelos tratamentos avaliados



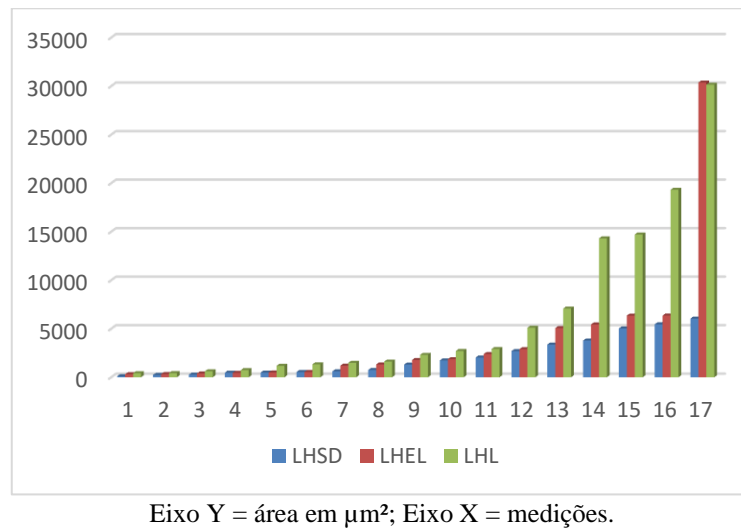
A Figura 20 mostra a distribuição das médias de área dos grãos de leite humano em pó. Os grãos obtidos pelo tratamento LHSD apresentam menor área, seguida pelo tratamento LHEL e posteriormente LHL que formou grãos com as maiores áreas. Tanto o tratamento LHEL quanto o LHL apresentaram grãos com área fora das médias (LHEL – 30370; LHL – 30147 μm^2).

Figura 20 – Distribuição de área do grão do leite em pó nos diferentes tratamentos



As diferenças nas áreas dos grãos de leite humano em pó produzidos em cada tratamento (Figura 21) mostram que existem grãos de área semelhante entre os tratamentos, entretanto o LHSD formou grãos de áreas semelhantes sendo mais homogêneo.

Figura 21 – Áreas dos grãos de leite humano em pó nos diferentes tratamentos



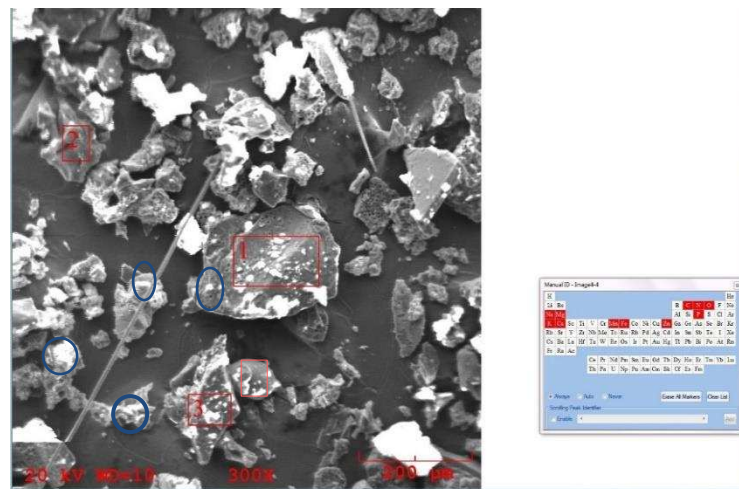
O tratamento LHEL apresentou a maior parte dos grãos com área semelhante ao tratamento LHSD, entretanto apresentou grãos de área muito elevada ($30.370 \mu\text{m}^2$). Já no tratamento LHL foi possível verificar nos grãos observados vários grãos de tamanho mais elevado que os obtidos pelos outros tratamentos.

4.8. Espectrometria de raio X por energia dispersiva (EDS)

A análise de EDS permite avaliar a composição dos minerais do grão como mostrado na Figura 22. Minerais foram encontrados em todo grão, uma maior concentração foi localizada na posição central do grão formado durante a secagem do leite humano.

Com a retirada da água, os minerais e substâncias mais hidrofílicas tendem a se locomover para o centro do grão (BIRCHAL et al., 2005).

Figura 22 – Micrografia com mapeamento composicional por espectrometria de raio X por energia dispersiva (EDS)



Retângulos vermelhos = concentração de minerais centralizados.
Círculos azuis = minerais espaçados.

A Figura 22 mostra a distribuição de elementos minerais e do oxigênio na região mais centralizada do grão (retângulos vermelhos). Verifica-se também a presença de minerais em outras partes do grão (partes circuladas em azul).

A distribuição percentual em massa dos minerais no grão, não apresentou diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos pela análise estatística ANOVA. Uma exceção é o sódio que apresentou diferença significativa pelo teste de Tukey (Tabela 13).

Tabela 13 – Distribuição percentual em massa dos minerais presentes no grão de leite humano em pó em cada tratamento

	LHSD	± sd	LHEL	± sd	LHL	± sd
C	40,82	± 1,25	46,47	± 4,43	44,52	± 0,64
O	55,77	± 1,021	49,87	± 4,19	50,7	± 0,63
Na	0,43 ab	± 0,038	0,35 b	± 0,089	0,67 a	± 0,16
Mg	0,43	± 0,032	0,39	± 0,051	0,53	± 0,088
P	0,44	± 0,015	0,42	± 0,048	0,58	± 0,15
K	1,22	± 0,17	1,56	± 0,023	1,45	± 0,14
Ca	0,63	± 0,091	0,83	± 0,21	0,79	± 0,21
Fe	0,08	± 0,019	0,11	± 0,03	0,07	± 0,023
Zn	0,12	± 0,053	0,16	± 0,054	0,11	± 0,013

Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey; sd = desvio padrão; LHSD = Leite humano spray dryer; LHEL = Leite humano evaporado liofilizado; LHL = Leite humano liofilizado.

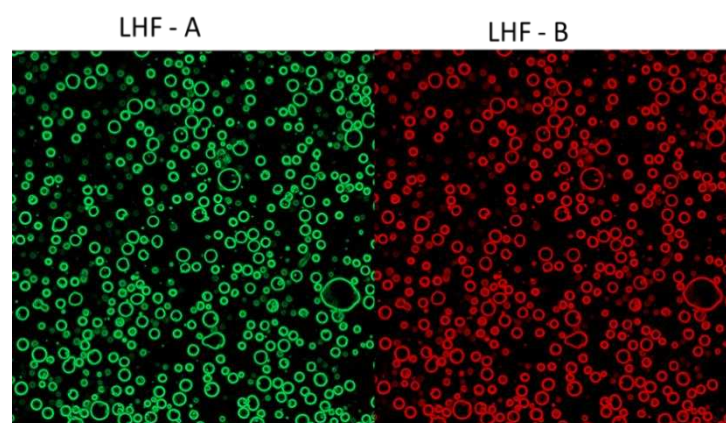
A composição dos elementos da amostra foi assumida como a composição elementar dos componentes puros da amostra. A gordura e a proteína normalmente apresentam maiores teores carbono (70 e 89% respectivamente) e teores de oxigênio entre 16 e 11% respectivamente, enquanto a lactose apresenta valores de 55% de carbono e 45% de oxigênio (VIGNOLLES et al., 2009).

4.9. Microscopia confocal

Na microscopia confocal foram observadas a coloração vermelha para os glóbulos de gordura e a coloração verde para as proteínas. Em todos os tratamentos, assim como no LHF (controle), foi observada a presença dos glóbulos de gordura e a de proteínas dispersas no meio. Modificações nos formatos destes componentes do leite humano foram observadas após a secagem empregados.

Nas micrografias confocais do LHF (Figura 23) observam-se glóbulos de gordura bem definidos; com variações de diâmetro de 1,11 μm a 13,4 μm , média de $6,36 \pm 2,7 \mu\text{m}$ e um coeficiente de variação (C.V.) de 47,4%; com presença bem marcada de proteínas na membrana do glóbulo. Os pontos proteicos estão dispersos no meio (pontos verdes mais brilhantes). Não há presença de aglomerados proteicos nem a adsorção de proteínas aos glóbulos de gordura.

Figura 23 – Micrografia confocal do LHF

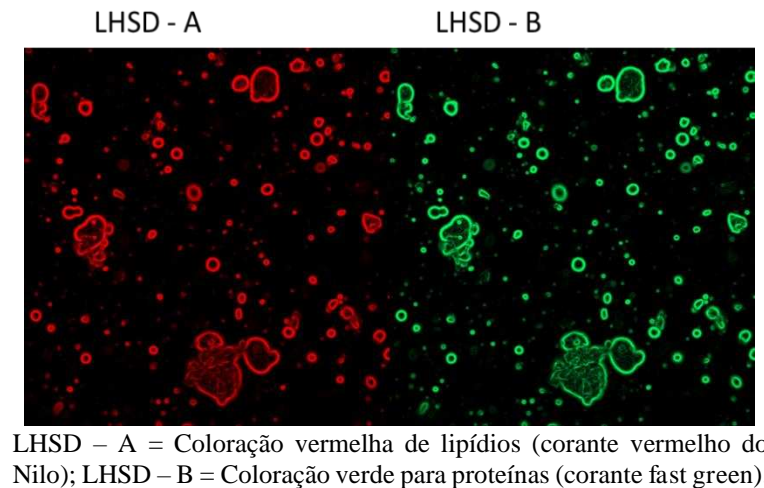


LHF – A = Coloração vermelha de lipídios (corante vermelho do Nilo); LHF – B = Coloração verde para proteínas (corante fast green).

A espessura da membrana do glóbulo de gordura no LHF é praticamente homogênea, com média de $1,49 \pm 0,38 \mu\text{m}$ e C.V. de 25,29%. As membranas do glóbulo de gordura no LHF são de formato circular em sua maioria e não apresentam rompimento de membrana.

O tratamento LHSD formou glóbulos de gordura de tamanhos médios e pequenos, assim como proteínas aderidas na superfície destes glóbulos (Figura 24). Pontos proteicos livres, além de uma aglomeração proteica unida a lipídios no inferior da imagem são visíveis na Figura 24B. Os pontos de proteínas observados no LHSD variam grandemente de tamanho ($1,95$ a $27,01 \mu\text{m}$), apresentando desvio padrão de 7,35 e C.V. de 36,91%.

Figura 24 – Micrografia confocal do LHSD

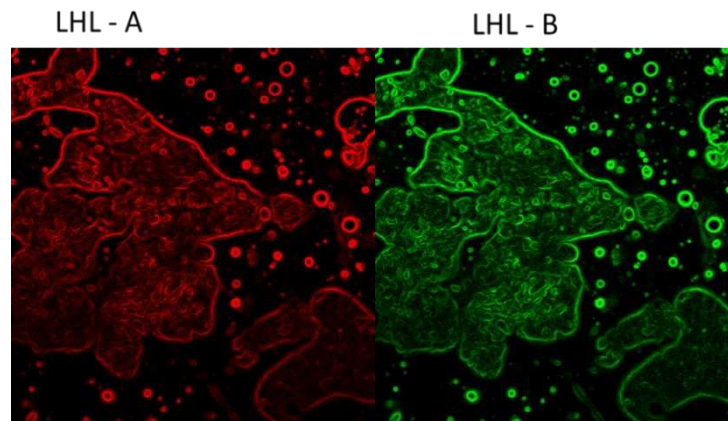


Em alguns glóbulos de gordura da Figura 24 A, verificou-se um “murchamento”, causando a perda de forma no glóbulo de gordura. Os diâmetros dos glóbulos de gordura do LHSD apresentaram grande variação ($1,39 - 13,65$), com média de diâmetro de $5,84 \pm 2,71 \mu\text{m}$ e C.V. de 42,76%.

Na Figura 25, uma aglomeração proteica disforme de tamanho maior ($7766,11 \mu\text{m}^2$ de área) está envolta por lipídios. Observa-se a presença de glóbulos de gordura e proteínas livres.

As membranas dos glóbulos de gordura do LHL, diferentemente do LHSD, não apresentaram murchamento, e não se verificou rupturas nas mesmas. A espessura da membrana do LHL apresentou média $1,98 \pm 0,22 \mu\text{m}$, pontos fora da média com mínimo de $1,11 \mu\text{m}$ e máximo de $2,51 \mu\text{m}$ e C.V. de 79,1%. Quanto aos pontos fora da média para LHSD, o ponto inferior foi $1,11 \mu\text{m}$, o ponto superior foi $2,71 \mu\text{m}$ e a média foi $1,98 \pm 0,39 \mu\text{m}$.

Figura 25 – Micrografia confocal do LHL

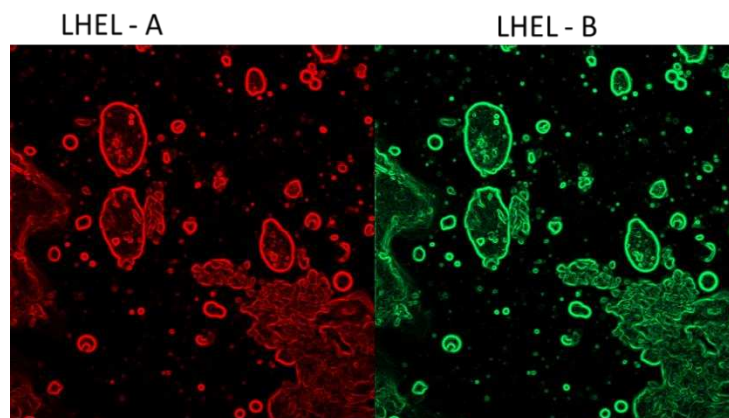


LHL – A = Coloração vermelha de lipídios (corante vermelho do Nilo); LHL – B = Coloração verde para proteínas (corante fast green).

O diâmetro dos glóbulos de gordura do LHL apresentou média de $8,32 \pm 3,92 \mu\text{m}$, ponto inferior fora da média de $1,67 \mu\text{m}$ e superior de $15,76 \mu\text{m}$, e C.V. de 52,78%.

A microscopia confocal do LHEL (Figura 26) apresenta aglomerações proteicas, assim como no LHL, e depósito de proteínas na superfície dos glóbulos de gordura, assim como no LHSD.

Figura 26 – Micrografia confocal do LHEL



LHEL – A = Coloração vermelha de lipídios (corante vermelho do Nilo); LHEL – B = Coloração verde para proteínas (corante fast green).

A área do maior aglomerado de proteínas verificado na análise do LHEL foi de $2416,027 \mu\text{m}^2$, sendo bem menor que a observada no LHL. O diâmetro máximo da área proteica do LHEL foi de $61,5 \mu\text{m}$ com média de $15,24 \mu\text{m}$, enquanto para LHL foi de $107,7 \mu\text{m}$ com

média de 38,12 μm . Já para o LHSD, o diâmetro proteico foi de 27,01 μm com média de 9,97 μm e para LHF de 11,86 μm com média de 5,59 μm (Figura 23).

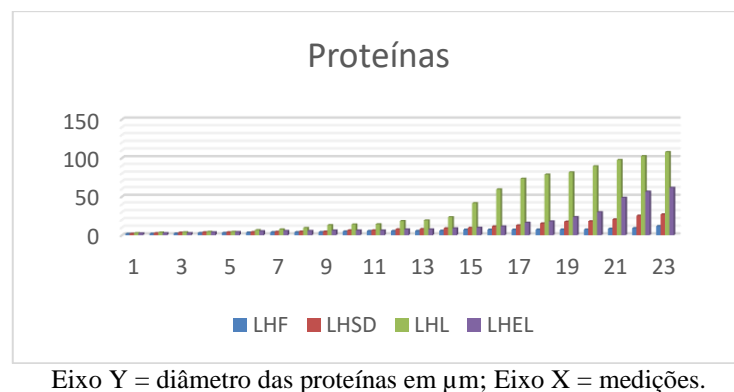
Assim, o tratamento da secagem por liofilização favoreceu a formação de aglomerados proteicos maiores, entretanto quando o LH foi submetido a evaporação antes da liofilização, o tamanho do aglomerado proteico foi reduzido em 68,9%.

As membranas dos glóbulos de gordura do LHEL apresentaram variações em suas espessuras de 1,12 a 2,34 μm , mas alguns glóbulos exibiram deformações em suas membranas.

No LHEL foram observados glóbulos de gordura com tamanhos heterogêneos, com diâmetros de 1,4 a 19,57 μm , média de $11,19 \pm 4,76\mu\text{m}$, e C.V. 57,19%. Este foi o tratamento que apresentou maior tamanho nos glóbulos de gordura e o maior C.V.

Grandes variações nos tamanhos dos aglomerados proteicos são observadas na Figura 27.

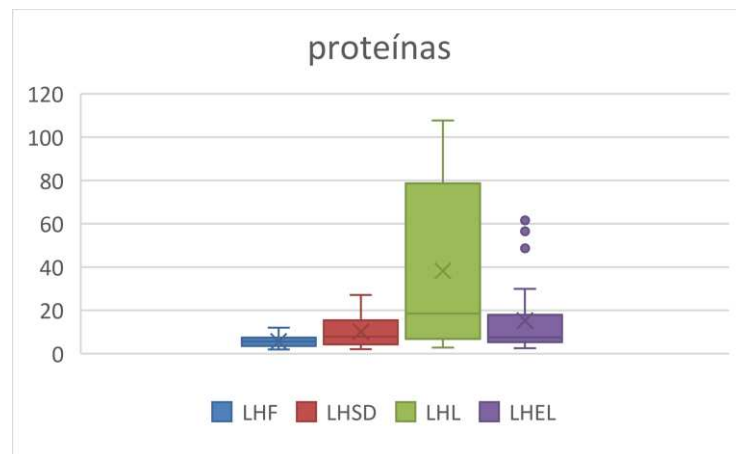
Figura 27 – Diâmetro das proteínas em cada tratamento



A Figura 27 mostra que o LHF possui baixa variabilidade no tamanho das proteínas, o LHSD contém aglomerados de proteínas de diâmetro maior, o LHEL contém aglomerados com diâmetros proteicos duas vezes maiores que o LHSD. Já o LHL foi o tratamento que apresentou aglomerado proteico de maior tamanho com quase duas vezes o diâmetro do apresentado pelo LHEL.

A distribuição do diâmetro das proteínas vista na Figura 28, mostra uma grande variação no diâmetro das proteínas para o LHL. O LHEL apresenta médias de diâmetro próximas às do LHSD, entretanto, com pontos fora da média, gerando aglomerados proteicos de tamanho muito acima da média.

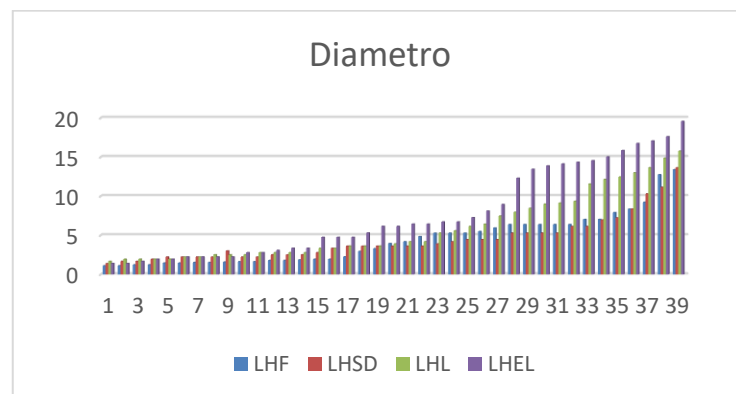
Figura 28 – Diâmetro das proteínas em cada tratamento



Eixo Y = diâmetro das proteínas em μm ; Eixo X = tratamentos.

A Figura 29 mostra as diferenças nos diâmetros dos glóbulos de gordura nos tratamentos. Os diâmetros dos glóbulos de gordura do LHF e LHSD se encontram mais próximos, enquanto o diâmetro nos tratamentos LHL e LHEL possuem maior variação com glóbulos de diâmetro maior, sendo o maior deles presente no LHEL.

Figura 29 – Diâmetro do glóbulo de gordura em cada tratamento



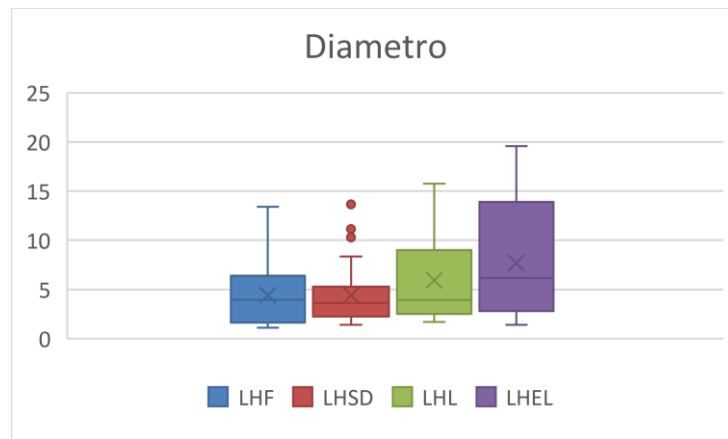
Eixo Y = diâmetro dos glóbulos de gordura em μm ; Eixo X = medições.

A redução lenta e gradativa do teor de água durante a evaporação realizada no tratamento LHEL pode levar à auto agregação dos glóbulos de gordura e a agregação de outros componentes a ele. Este comportamento ocasiona o aumento no diâmetro do glóbulo de gordura e variações nos seus tamanhos conforme relatado por Vignolles et al. (2009) e que é corroborado com os dados da presente pesquisa.

A distribuição do diâmetro dos glóbulos de gordura (Figura 30) mostra que o tratamento LHSD apresentou a menor variação na média nos tamanhos dos glóbulos de gordura, apesar de apresentar pontos fora da curva com maior diâmetro.

O tratamento que apresentou maiores valores de média assim como tamanho total foi o LHEL seguido do LHL e posteriormente LHF.

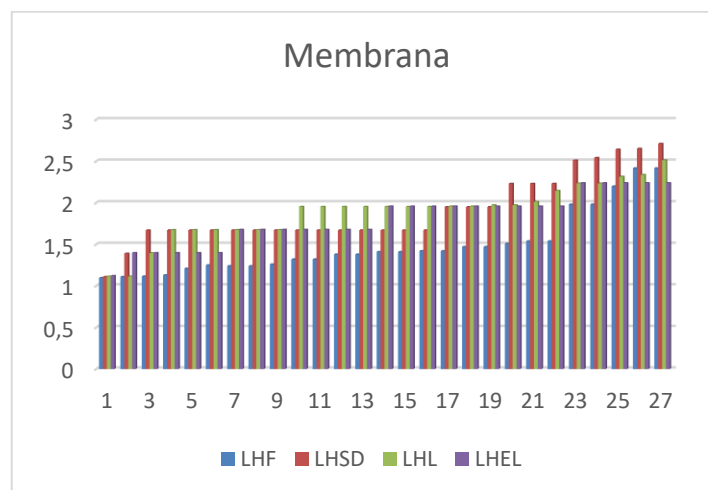
Figura 30 – Diâmetro dos glóbulos de gordura em cada tratamento



Eixo Y = diâmetro dos glóbulos de gordura em μm ; Eixo X = tratamentos.

A Figura 31 indica que não ocorre grande variação na espessura das membranas dos glóbulos de gordura devido aos tratamentos, entretanto o tratamento que apresentou membranas mais espessas foi o LHSD.

Figura 31 – Espessura da membrana do glóbulo de gordura em cada tratamento

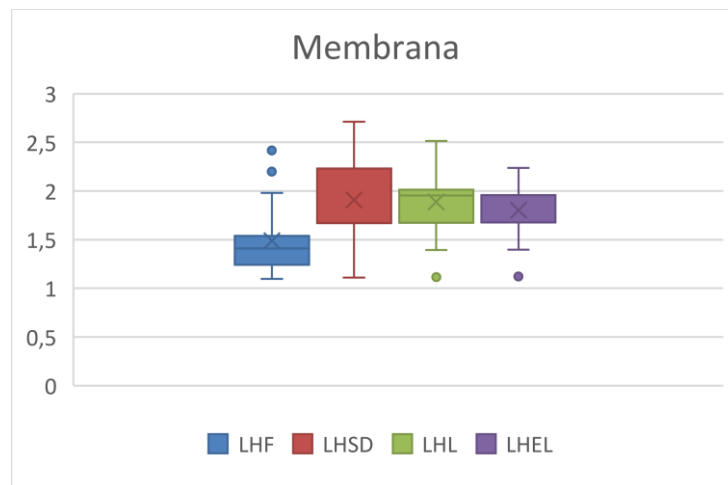


Eixo Y = espessura da membrana do glóbulo de gordura em μm ;
Eixo X = medições.

Durante a secagem em spray dryer pode ocorrer a adesão de proteínas aos lipídios, como visto na Figura 24, esta adesão pode vir a aumentar sua espessura da membrana.

Pela distribuição de espessura da membrana observada na Figura 32, o tratamento LHSD apresenta médias com maior espessura na membrana do glóbulo de gordura, apesar da média geral ser próxima às dos tratamentos LHL e LHEL.

Figura 32 – Distribuição da espessura da membrana dos glóbulos de gordura em cada tratamento



O LHF apresentou menor média de espessura da membrana dos glóbulos de gordura com pontos de maior valor fora da média, enquanto os tratamentos LHL e LHEL pontos de menor valor fora da média (Figura 32).

A capacidade reconstituente do leite em pó é afetada pelo tamanho dos grãos dos pós, diâmetro dos glóbulos de gordura, pela adsorção das proteínas nos glóbulos de gordura e insolubilização de proteínas livres devida à secagem (VIGNOLLES et al., 2009; ROGERS et al., 2012; CHEVER et al., 2017).

Fator este que pode ser verificado ao observar as características dos grãos de leite em pó obtidos nos tratamentos, onde quando comparamos com os dados de dispersibilidade, molhabilidade e densidade aparente, percebemos a influência dos tamanhos dos grãos nestes dados, assim como as aglomerações ocorridas com proteínas nos grãos, como a ocorrida no tratamento LHEL a qual apresentou melhores resultados na dispersibilidade e molhabilidade.

5. CONCLUSÃO

Os três tratamentos de secagem produziram leite humano em pó com qualidade nutricional. O LHL foi o que apresentou a composição nutricional mais próxima ao do leite humano fluido. Quanto à facilidade de reconstituição, o melhor tratamento foi o do LHEL. Entretanto, o leite humano em pó obtido por spray dryer (LHSD) é o indicado se a finalidade for a nutrição de neonatos pois apresentou além de uma boa manutenção dos nutrientes do leite uma boa capacidade reconstituente.

CONCLUSÃO GERAL

Esta pesquisa aponta para a factibilidade da obtenção de leite humano processado. Mesmo que ocorram perdas nutricionais no leite humano devido aos processamentos, as possibilidades de utilização produtos processados podem compensá-las. O processamento por meio da pasteurização e homogeneização possibilitará a redução do volume de descarte do leite humano, a secagem possibilitará economia no transporte, aumento do tempo de armazenamento e maior gama de utilização do leite humano em pó. Uma sugestão é a utilização do leite humano em pó para fortificação do leite entregue pelo banco de leite humano aos neonatos a termo.

Com os dados desta pesquisa espera-se guiar para novas pesquisas com análises sobre a segurança alimentar, com testes com animais e posteriormente concluir a produção de um leite humano ordenhado em pó de qualidade para ser utilizado pelo banco de leite humano.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, S. A. Building bones in babies: can and should we exceed the human milk-fed infant's rate of bone calcium accretion? **Nutrition Reviews**, v. 64, n. 11, p. 487-494, 2006.
- ADAM, A. C.; RUBIO-TEXEIRA, M.; POLAINA, J. Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 7-8, p. 553-557, 2004.
- AHMAD, S. et al. Factors affecting yield and composition of camel milk kept under desert conditions of central Punjab, Pakistan. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 7, p. 1403-1410, 2012.
- ALMEIDA, J. A. G. de; GUIMARÃES, V.; NOVAK, F. R. **Seleção e classificação do leite humano ordenhado cru**. Disponível em: https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/79/nt_23.11_selec._classif_lhocru.pdf. Acesso em: 21 set. 2020.
- ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; LE-DOARE, K. M. Human breast milk: a review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**, v. 91, n. 11, p. 629-635, 2016.
- BAKER, R. D. et al. Clinical report - diagnosis and prevention of iron deficiency and iron-deficiency anemia in infants and young children (0-3 years of age). **Pediatrics**, v. 126, n. 5, p. 1040-1050, 2010.
- BAR-YOSEPH, F. et al. SN2-palmitate reduces fatty acid excretion in Chinese formula-fed infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 62, n. 2, p. 341-347, 2016.
- BARREIRO, R. et al. Fatty acid composition of breast milk in Galicia (NW Spain): a cross-country comparison. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 135, p. 102-114, 2018.
- BATISTON, W. P. et al. Absolute quantification of fatty acid and proximate composition of cow and goat powdered milks. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1907-1914, 2012.
- BAUER, J.; GERSS, J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. **Clinical Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 215-220, 2011.
- BERGSSON, G. et al. Killing of gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. **Apmis**, v. 109, n. 10, p. 670-678, 2001.
- BIRCHAL, V. S. et al. Effect of spray-dryer operating variables on the whole milk powder quality effect of spray-dryer operating variables on the whole milk powder quality. **Drying Technology**, v. 23, p. 611-636, 2005.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BRAGA, L. P. M.; PALHARES, D. B. Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 1, p. 59-63, 2007.

BRAGA, M. B.; ROCHA, S. C. dos S.; HUBINGER, M. D. Spray-drying of milk–blackberry pulp mixture: effect of carrier agent on the physical properties of powder, water sorption, and glass transition temperature. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 6, p. 1650-1659, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 171 - Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos e Leite Humano**. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2006/res0171_04_09_2006.html. Acesso em: 15 nov. 2019.

BRASIL. **Lei n. 11.265, de 3 de janeiro de 2006**. Regulamenta a comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância e também a de produtos de puericultura correlatos. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Lei/L11265.htm. Acesso em: 30 mar. 2021.

BRENNAN, J. T. et al. Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 6, p. 1457-1464, 2007.

CANO-CHAUCA, M. et al. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, n. 4, p. 420-428, 2005.

CASTRO-ALBARRÁN, J. et al. Spray and freeze drying of human milk on the retention of immunoglobulins (IgA, IgG, IgM). **Drying Technology**, v. 34, n. 15, p. 1801-1809, 2016.

CEDERLUND, A. et al. Lactose in human breast milk an inducer of innate immunity with implications for a role in intestinal homeostasis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

CHEVER, S. et al. Agglomeration during spray drying: physical and rehydration properties of whole milk/sugar mixture powders. **LWT – Food Science and Technology**, v. 83, p. 33-41, 2017.

CHNADHAPURAM, M.; SUNKIREDDY, Y. R. Preparation of palm olein enriched with medium chain fatty acids by lipase acidolysis. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 216-221, 2012.

DABADIE, H. et al. Moderate intake of myristic acid in sn-2 position has beneficial lipidic effects and enhances DHA of cholesteryl esters in an interventional study. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 6, p. 375-382, 2005.

DAVIDOFF, F.; KORN, E. D. The conversion of long chain saturated fatty acids to their alpha. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 8, p. 2496-2506, 1964.

DE SALES, R. L. et al. Desenvolvimento de um inquérito para avaliação da ingestão alimentar de grupos populacionais. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 5, p. 539-552, 2006.

DELPLANQUE, B. et al. Lipid quality in infant nutrition: current knowledge and future opportunities. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 61, n. 1, p. 8-17, 2015.

DEMMELMAIR, H.; KOLETZKO, B. Lipids in human milk. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 32, p. 57-68, 2018.

DROR, D. K.; ALLEN, L. H. Overview of nutrients in human milk. **Advantages in Nutrition**, v. 9, p. 278S-294S, 2018.

EASTMAN, J. E., MOORE, C. O. **Cold water soluble granular starch for gelled food composition**. 1984. (U.S. Patent 4465702).

EIDELMAN, A. I.; SCHANLER, R. J. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 129, n. 3, 2012.

EITH, C.; KOLB, M.; RUMI, A.; SEUBERT, A.; VIEHWEGER, K. H. Práticas em cromatografia de íons: uma introdução. 2. ed. Herisau, 2006. (Monografia Metrohm).

ELISIA, I.; KITTS, D. D. Quantification of hexanal as an index of lipid oxidation in human milk and association with antioxidant components. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 49, n. 3, p. 147-152, 2011.

ENRÍQUEZ-FERNÁNDEZ, B. E.; CAMARILLO-ROJAS, C. R.; VÉLEZ-RUIZ, J. F. Physical properties of concentrated milk and its influence on powder milk characteristics and spray dryer design parameters. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 1, p. 87-94, 2013.

ESTÉVEZ-GONZÁLEZ, M. D. et al. HDL cholesterol levels in children with mild hypercholesterolemia: effect of consuming skim milk enriched with olive oil and modulation by the TAQ 1B polymorphism in the CETP gene. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 56, n. 4, p. 288-293, 2010.

FREUDIG, B.; HOGEKAMP, S.; SCHUBERT, H. Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 38, n. 4-6, p. 525-532, 1999.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (Rio de Janeiro). Centro de Referência Nacional para Bancos de Leite Humano. Instituto Fernandes Figueira. **BLH/IFF-NT-23.11**: seleção e classificação do leite humano ordenhado cru. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2011.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (Rio de Janeiro). **rBLH-Brasil**. Disponível em: <https://rblh.fiocruz.br/rblh-brasil>. Acesso em: 25 out. 2019.

GAO, C. et al. Comparison of human milk fatty acid composition of women from Cambodia and Australia. **Journal of Human Lactation**, v. 34, n. 3, p. 585-591, 2018.

GAWRYSIAK-WITULSKA, M. et al. The effect of temperature and moisture content of stored rapeseed on the phytosterol degradation rate. **JAACS - Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 9, p. 1673-1679, 2012.

GEORGE, A. D. et al. Human milk lipidomics: current techniques and methodologies. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1169, 2018.

GIANNI, M. L.; ROGGERO, P.; MOSCA, F. Human milk protein vs. formula protein and their use in preterm infants. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 22, n. 1, p. 76-81, 2019.

GOYENS, P. L. L. et al. Conversion of α -linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of α -linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 44-53, 2006.

GROTE, V. et al. Breast milk composition and infant nutrient intakes during the first 12 months of life. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 2, p. 250-256, 2016.

HASHEMI, S. M. B. et al. Fermentation of sarshir (kaymak) by lactic acid bacteria: antibacterial activity, antioxidant properties, lipid and protein oxidation and fatty acid profile. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 13, p. 4595-4603, 2017.

HAUG, A.; OLESEN, I.; CHRISTOPHERSEN, O. A. Individual variation and intraclass correlation in arachidonic acid and eicosapentaenoic acid in chicken muscle. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 37, 2010.

HE, Y.-B. et al. Comparing the composition and trend of fatty acid in human milk with bovine milk and infant formula in northeast region of China. **CyTA – Journal of Food**, v. 14, n. 4, p. 632-638, 2016.

HOFFMAN, D. R.; BOETTCHER, J. A.; DIERSEN-SCHADE, D. A. Toward optimizing vision and cognition in term infants by dietary docosahexaenoic and arachidonic acid supplementation: a review of randomized controlled trials. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 2-3, p. 151-158, 2009.

HØSTMARK, A. T.; HAUG, A. Percentages of oleic acid and arachidonic acid are inversely related in phospholipids of human sera. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2013.

INNIS, S. M. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. **American Society for Nutrition - The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 855-859, 2007.

INNIS, S. M. Omega-3 fatty acids and neural development to 2 years of age: do we know enough for dietary recommendations? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 16-24, 2009.

INNIS, S. M. Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 275-283, 2011.

INNIS, S. M. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, n. 3, p. 734-741, 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físicos-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: IAL, 2008. 1.020 p.

IP, S. et al. A summary of the agency for healthcare research and quality's evidence report on breastfeeding in developed countries. **Breastfeeding Medicine**, v. 4, n. 1, p. S17-S30, 2009.

- ISAACS, E. B. et al. Impact of breast milk on intelligence quotient, brain size, and white matter development. **International Pediatric Research Foundation**, v. 67, n. 4, p. 357-362, 2010.
- JUBER, B. A. et al. Breast milk DHA levels may increase after informing women: a community-based cohort study from South Dakota USA. **International Breastfeeding Journal**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2017.
- KHAN, M. K. et al. Effect of novel technologies on polyphenols during food processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 361-381, 2018.
- KIM, J.; FRIEL, J. Lipids and human milk. **Lipid Technology**, v. 24, n. 5, p. 103-105, 2012.
- KIM, H. et al. Breast milk fatty acid composition and fatty acid intake of lactating mothers in South Korea. **British Journal of Nutrition**, v. 117, n. 4, p. 556-561, 2017.
- KIM, T. S. et al. Determination of the degree of oxidation in highly-oxidised lipids using profile changes of fatty acids. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1792-1799, 2013.
- KOH, E.; SURH, J. Food types and frying frequency affect the lipid oxidation of deep frying oil for the preparation of school meals in Korea. **Food Chemistry**, v. 174, p. 467-472, 2015.
- KOLETZKO, B. et al. Compositional requirements of follow-up formula for use in infancy: Recommendations of an international expert group coordinated by the early nutrition academy. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 62, n. 1, p. 44-54, 2013.
- KUCEVIC, D. et al. The composition of goat milk in different types of farmings. **Biotechnology in Animal Husbandry** *Biotehnologija u Stocarstvu*, v. 32, n. 4, p. 403-412, 2016.
- LAPILLONNE, A. et al. Lipid needs of preterm infants: updated recommendations. **Journal of Pediatrics**, v. 162, n. 3, p. 37-47, 2013.
- LEBER, C. et al. Disrupted short chain specific β -oxidation and improved synthase expression increase synthesis of short chain fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 4, p. 895-900, 2016.
- LEE, J. et al. Novel convenient method to determine wettability and dispersibility of dairy novel convenient method to determine wettability and dispersibility of dairy powders. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 34, n. 6, p. 852-857, 2014.
- LI, C. et al. Minerals and trace elements in human breast milk are associated with guatemalan infant anthropometric outcomes within the first 6 months. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 10, p. 2067-2074, 2016.
- LIMA, E. da S. et al. Condições sócio-econômicas, alimentação e nutrição da população urbana de uma localidade do estado de Minas Gerais (Brasil). **Revista Saúde Pública de São Paulo**, v. 23, p. 410-421, 1989.
- LIU, K.; LIU, Y.; CHEN, F. Effect of storage temperature on lipid oxidation and changes in nutrient contents in peanuts. **Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 7, p. 2280-2290, 2019.

- LÖNNERDAL, B. Bioactive proteins in human milk: health, nutrition, and implications for infant formulas. **Journal of Pediatrics**, v. 173, p. S4-S9, 2016.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A. et al. The influence of dietary palmitic acid triacylglyceride position on the fatty acid, calcium and magnesium contents of at term newborn faeces. **Early Human Development**, v. 65, n. 2, 2001.
- LUCAS, A. et al. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat and energy value of human milk. **British Medical Journal**, v. 1, n. 6119, p. 1018-1020, 1978.
- MARIUTTI, L. R. B.; NOGUEIRA, G. C.; BRAGAGNOLO, N. Lipid and cholesterol oxidation in chicken meat are inhibited by sage but not by garlic. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. C909-C915, 2011.
- MARTÍNEZ, B. et al. Development of a simple method for the quantitative determination of fatty acids in milk with special emphasis on long-chain fatty acids. **CyTA Journal of Food**, v. 6337, 2012.
- MORGANO, M. A. et al. Composição mineral do leite materno de bancos de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 819-824, 2005.
- NAH, T. et al. OH-initiated oxidation of sub-micron unsaturated fatty acid particles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, p. 18649-18663, 2013.
- NISHIMURA, R. Y. et al. Breast milk fatty acid composition of women living far from the coastal area in Brazil. **Jornal de Pediatria**, v. 89, n. 3, p. 3-8, 2013.
- NOVAK, E. M.; DYER, R. A.; INNIS, S. M. High dietary ω -6 fatty acids contribute to reduced docosahexaenoic acid in the developing brain and inhibit secondary neurite growth. **Brain Research**, v. 1237, p. 136-145, 2008.
- NYHAN, L. et al. Predicting the combinatorial effects of water activity, pH and organic acids on *Listeria* growth in media and complex food matrices. **Food Microbiology**, v. 74, p. 75-85, 2018.
- O'CONNOR, D. L.; EWASCHUK, J. B.; UNGER, S. Human milk pasteurization: benefits and risks. **Paediatrics**, p. 269-275, 2015.
- OUIMET, C. M. et al. Protein cross-linking capillary electrophoresis for protein-protein interaction analysis. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 16, p. 8272-8278, 2016.
- OVEISI, M. R. et al. Human breast milk provides better antioxidant capacity than infant formula. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 445-449, 2010.
- PATEL, A. L.; KIM, J. H. Human milk and necrotizing enterocolitis. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 27, n. 1, p. 34-38, 2018.
- PEARCE, D. L. A novel way to measure the concentration of a spray in a spray dryer. **Drying Technology**, v. 24, n. 6, p. 777-781, 2006.
- PERMANYER, M. et al. Maintenance of breast milk immunoglobulin A after high-pressure processing. **Journal of Dairy Science**, p. 877-883, 2010.

PETIT, V.; SANDOZ, L.; GARCIA-RODENAS, C. L. Importance of the regiospecific distribution of long-chain saturated fatty acids on gut comfort, fat and calcium absorption in infants. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 121, p. 40-51, 2017.

PETIT, J. et al. Storage-induced caking of cocoa powder. **Journal of Food Engineering**, v. 199, p. 42-53, 2017.

PICAUD, J.-C.; BUFFIN, R. Human milk – treatment and quality of banked human milk. **Clinics in Perinatology**, v. 44, n. 1, p. 95-119, 2017.

PRATT, D. A.; TALLMAN, K. A.; PORTER, N. A. Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: New mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 6, p. 458-467, 2011.

QIAN, J. et al. Breast milk macro - and micronutrient composition in lactating mothers from suburban and urban Shanghai. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 46, p. 115-120, 2010.

QUIGLEY, M.; EMBLETON, N. D.; McGUIRE, W. Formula versus maternal breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 6, 2018.

R – THE R Project for Statistical Computing. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 31 mar. 2019.

RIOUX, V. et al. Dietary myristic acid at physiologically relevant levels increases the tissue content of C20:5n-3 and C20:3n-6 in the rat. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 91-103, 2005.

RIOUX, V. et al. Substitution of dietary oleic acid for myristic acid increases the tissue storage of α -linolenic acid and the concentration of docosahexaenoic acid in the brain, red blood cells and plasma in the rat. **Animal**, v. 2, n. 4, p. 636-644, 2008.

RIOUX, V.; LEGRAND, P. Saturated fatty acids: simple molecular structures with complex cellular functions. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n. 6, p. 752-758, 2007.

RIOUX, V.; PÉDRONO, F.; LEGRAND, P. Regulation of mammalian desaturases by myristic acid: N-terminal myristoylation and other modulations. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 1, p. 1-8, 2011.

ROBINSON, D. T. et al. Long chain fatty acids and related pro-inflammatory, specialized pro-resolving lipid mediators and their intermediates in preterm human milk during the first month of lactation. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 121, p. 1-6, 2017.

ROGERS, S. et al. A monodisperse spray dryer for milk powder: modelling the formation of insoluble material. **Chemical Engineering Science**, v. 71, p. 75-84, 2012.

ROZENDO, C. A.; HOLANDA, J. B. L.; SANTOS, R. C. C.; VALVERDE, R. C. Donated breast milk: causes of waste. **Revista de Enfermagem. UERJ**, v. 17, n. 4, p. 533-537, 2009.

RYAN, M. et al. Diabetes and the mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity. **Quartely Journal of Medicine**, v. 93, n. 2, p. 85-91, 2000.

SABETIAN, M. et al. Identification and changes in fatty acid profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet during frozen storage (-18°C). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 23, n. 4, p. 321-332, 2014.

SALCEDO, J. et al. Human milk bactericidal properties: effect of lyophilization and relation to maternal factors and milk components. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 60, n. 4, p. 527-532, 2015.

SCHUCHARDT, J. P. et al. Effect of DHA supplementation on oxylipin levels in plasma and immune cell stimulated blood. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 121, p. 76-87, 2017.

SCHUCK, P. et al. Thermohygroscopic sensor: a tool for optimizing the spray drying process. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, n. 1, p. 45-50, 2005.

SCHUCK, P. et al. Drying by desorption: a tool to determine spray drying parameters. **Journal of Food Engineering**, v. 94, n. 2, p. 199-204, 2009.

SCHUCK, P. et al. Spray drying of dairy bacteria: new opportunities to improve the viability of bacteria powders. **International Dairy Journal**, v. 31, p. 12-17, 2013.

SFAKIANAKIS, P.; TOPAKAS, E.; TZIA, C. Comparative study on high-intensity ultrasound and pressure milk homogenization: effect on the kinetics of yogurt fermentation process. **Food Bioprocess Technology**, v. 8, p. 548-557, 2015.

SHICHIRI, M. et al. DHA concentration of red blood cells is inversely associated with markers of lipid peroxidation in men taking DHA supplement. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 196-202, 2014.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 352-359, 2006.

SMITH, S. L.; DOBBINS, C. Every drop counts - protecting high-risk neonates with human milk. **ICAN: Infant, Child & Adolescent Nutrition**, v. 6, n. 5, p. 279-285, 2014.

SULLIVAN, S. et al. An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 4, p. 562- 567, 2010.

SUN, C. et al. Evaluation of sn-2 fatty acid composition in commercial infant formulas on the Chinese market: a comparative study based on fat source and stage. **Food Chemistry**, v. 242, p. 29-36, 2018.

SUOMELA, J.; TARVAINEN, M.; KALLIO, H. Effects of microwave vs. convection oven heating on the formation of oxidation products in canola (*Brassica rapa* subsp. *oleifera*) oil. **Oilseeds & fats Crops and Lipids**, v. 24, n. 3, p. 4-7, 2017.

SWAMINATHAN, S. et al. Dietary iron intake and anemia are weakly associated, limiting effective iron fortification strategies in India. **Journal of Nutrition**, v. 149, n. 5, p. 831-839, 2019.

TOLLIN, M. et al. Vernix caseosa as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids and their interactions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 19-20, p. 2390-2399, 2005.

TOWLER, D. et al. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 69-99, 1988.

VENEMA, K. Intestinal fermentation of lactose and prebiotic lactose derivatives, including human milk oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 123-140, 2012.

VIEIRA, S. A.; ZHANG, G.; DECKER, E. A. Biological implications of lipid oxidation products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 94, n. 3, p. 339-351, 2017.

VIGNOLLES, M. L. et al. Fat properties during homogenization, spray-drying, and storage affect the physical properties of dairy powders. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 58-70, 2009.

VISSOTTO, F. Z. et al. Avaliação da influência dos processos de lecitinação e de aglomeração nas propriedades físicas de achocolatado em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 666-671, 2006.

WALKER, A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. **Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 2, p. 3-7, 2010.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. 808 p.

WEFFORT, V. R. S. et al. **Alimentação na escola, alimentação saudável e vínculo mãe-filho, alimentação saudável e prevenção de doenças, segurança alimentar**. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Sociedade Brasileira de Pediatria, 2012.

WEI, M. et al. Investigation of amino acids and minerals in Chinese breast milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, p. 3920-3931, 2020.

WU, T.-C. et al. Fatty acid composition of Taiwanese human milk. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 73, n. 11, p. 581-588, 2010.

YUHAS, R.; PRAMUK, K.; LIEN, E. L. Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA. **Lipids**, v. 41, n. 9, p. 2-4, 2006.

ZHOU, Y. et al. Freeze-drying of "pearl milk tea": a general strategy for controllable synthesis of porous materials. **Scientific Reports**, v. 6, p. 26438, 2016.