

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA TECNOLOGIA DO LEITE E
DERIVADOS

Ana Carolina dos Santos Moreira

Estudo da espectroscopia infravermelha em leite humano pasteurizado e cru

Juiz de Fora
2023

Ana Carolina dos Santos Moreira

Estudo da espectroscopia infravermelha em leite humano pasteurizado e cru

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientadora: Doutora Maria José Valenzuela Bell

Juiz de Fora
2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

dos santos Moreira , Ana Carolina .

Estudo da espectroscopia infravermelha em leite humano pasteurizado e cru / Ana Carolina dos santos Moreira . -- 2023.
72 p.

Orientadora: Maria José Valenzuela Bell

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2023.

1. Espectroscopia Infravermelho. 2. Leite humano. 3. Componentes nutricionais. I. Valenzuela Bell, Maria José , orient. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Maria José Valenzuela Bell -
Orientadora Universidade Federal de Juiz
de Fora**

**Prof. Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos
Universidade Federal de Juiz de Fora**

**Profa. Dra. Gisela de Magalhães Machado Moreira
EPAMIG/ILCT**

Juiz de Fora, 29/09/2023.



Documento assinado eletronicamente por Maria Jose Valenzuela Bell, Professor(a), em 09/11/2023, às 22:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por GISELA DE MAGALHAES MACHADO MOREIRA, Usuário Externo, em 10/11/2023, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Virgilio de Carvalho dos Anjos, Professor(a), em 21/11/2023, às 08:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1500972 e o código CRC 5D4FDA99.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, que guiou meus caminhos permitindo que eu embarcasse nessa jornada, que me deu toda força, determinação, resiliência e amadurecimento para a realização desse estudo. Agradeço a minha família, em especial, ao meu esposo Rafael Bertante, por todo seu apoio e por acreditar que eu era capaz. A minha mãe e meu pai, Ana Maria e Narciso, todo o amor e carinho por terem me ajudado com meu filho para que eu pudesse me dedicar ao mestrado. Ao meu filho Heitor, por quem eu luto todos os dias, minha força diária e melhor parte de mim, por tanto amor.

Agradeço também à minha orientadora, professora Maria José, pela oportunidade e confiança durante todo o mestrado. Aos meus amigos que conquistei ao longo do mestrado, em especial agradeço ao Grupo de Espectroscopia e Engenharia de Materiais (GE2M) da UFJF, onde pude desenvolver meu projeto, ao Professor Virgílio pelo auxílio. A UFJF e a todos os professores do Programa do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados (parceria EPAMIG/ILCT, EMBRAPA e UFJF), pela oportunidade de realização do curso. Ao Banco de leite de Juiz de Fora, todos os funcionários, que abriram as portas para realização dessa pesquisa.

Agradeço aos professores/pesquisadores membros da banca examinadora, por sua disponibilidade e contribuições positivas para este trabalho.

E a todos que, de alguma forma, fizeram parte da minha formação e tornaram possível a realização deste projeto, muito obrigada.

RESUMO

O leite humano tem grande importância na alimentação do lactente, isso se deve ao fato dele ser, indiscutivelmente, o alimento mais completo e seguro que os bebês podem receber. Apesar de ser rico em nutrientes, a sua composição nutricional sofre variações que depende de vários fatores, como: estágio de lactação, parto prematuro, tempo de gestação, esvaziamento da mama, hora e intervalo entre as mamadas, grau de pressão utilizado para extrair o leite, método e horário de coleta das amostras, intervalo entre gestações e a ingestão de álcool ou drogas. Este estudo foca em analisar a influência da pasteurização na composição do leite humano do Banco de leite localizado na cidade de Juiz de Fora (MG) com a técnica de Espectroscopia no Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FT-MIR). Para tal foram consideradas amostras de leite humano, 129 amostras de leite cru e 129 amostras de leite processado/pasteurizado, onde 6 amostras as mulheres estavam na fase colostro, 16 amostras encontravam na transição e 107 amostras no estágio final maduro. A ferramenta estatística usada para discriminar as amostras foi a Análise de Componentes Principais (PCA) e também ao método dos mínimos quadrados parciais (PLS), para avaliações quantitativas. Com os resultados não foi constatado que a pasteurização estaria alterando os componentes do leite, contudo, a espectroscopia no Infravermelho provou ser rápida e sensível, dessa forma bastante útil para analisar as amostras de leite humano bem como caracterizar as propriedades do leite em acidez e Kcal. Tendo sensibilidade para diferenciar as fases do leite humano.

Palavras-chaves: Infravermelho; Leite humano; Componentes nutricionais; Acidez.

ABSTRACT

Human milk is of great importance in infant nutrition, this is due to the fact that it is, indisputably, the most complete and safest food that babies can receive. Despite being rich in nutrients, its nutritional composition varies depending on several factors, such as: lactation stage, premature birth, gestation time, breast emptying, time and interval between feedings, degree of pressure used to extract the milk, sample collection method and time, interval between pregnancies and alcohol or drug intake. This study focuses on analyzing the influence of pasteurization on the composition of breast milk from the milk bank located in the city of Juiz de Fora (MG) using the Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy (FT-MIR) technique. For this purpose, samples of human milk were considered, 129 samples of raw milk and 129 samples of processed/pasteurized milk, where 6 samples were in the colostrum phase, 16 samples were in the transition and 107 samples were in the final mature stage. The statistical tool used to discriminate the samples was Principal Component Analysis (PCA) and also the partial least squares (PLS) method for quantitative evaluations. With the results, it was not found that pasteurization would be altering the components of the milk. However, Infrared spectroscopy has proven to be fast and sensitive, therefore very useful for analyzing human milk samples as well as characterizing the properties of milk in terms of acidity and Kcal. Having sensitivity to differentiate the phases of breast milk.

Keywords: Infrared; Human milk; Nutritional components; Acidity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Taxa de mortalidade infantil (menores de um ano de idade).	17
Figura 2 – Esquema das vias utilizadas na produção de leite pelas células alveolas.	22
Figura 3 – Fluxograma do funcionamento de um banco de leite humano.	29
Figura 4 – Congelamento do leite humano cru no banco de leite de Juiz de Fora	31
Figura 5 – Descongelamento do leite humano no banco de leite de Juiz de Fora	32
Figura 6 - Resfriamento do leite humano, após o descongelamento no Banco de Leite de Juiz de Fora	32
Figura 7 - Seleção e classificação do leite humano no banco leite de Juiz de Fora	34
Figura 8- Análise de acidez Dornic no leite humano do banco de leite de Juiz de Fora	35
Figura 9 – Análise de crematócrito no leite humano do banco leite de juiz de Fora	36
Figura 10 – Reenvase do leite cru para o recipiente em que ocorrerá a pasteurização.....	37
Figura 11 – Pasteurização do leite humano no banco de leite de Juiz de Fora	38
Figura 12 – Resfriamento do leite humano após a pasteurização	39
Figura 13 – Teste simplificado para detecção de coliformes totais no banco de leite de Juiz de Fora.....	41
Figura 14 – Congelamento do leite pasteurizado no banco de leite de Juiz de Fora	42
Figura 15 – Esquema de funcionamento da transformada de Fourier.	46
Figura 16 – Funcionamento de ATR.	48
Figura 17- Espectro de doadora no estágio de lactação colostro 256 C - 1154 P, para averiguação da alteração produzida pelo processamento/pasteurização.	55
Figura 18 - Espectro de doadora no estágio de lactação transição 202 C – 1178 P, para averiguação da alteração produzida pelo processamento/pasteurização.	55

Figura 19 - Espectro de doadora no estágio de lactação maduro 219 C e 1159 P, para averiguação da alteração produzida pelo processamento/pasteurização.	56
Figura 20 - Espectro de doadoras de leite cru, nos estágios de lactação colostro 256 C - 1154 P, transição 202 C – 1178 P e maduro 219 C e 1159 P, para comparação as variações de composições no leite cru e pasteurizado entre doadoras nos estágios de lactação.....	57
Figura 21 - Espectro de doadoras após o processo de pasteurização, nos estágios de lactação colostro 256 C - 1154 P, transição 202 C – 1178 P e maduro 219 C e 1159 P, para comparação as variações de composições no leite cru e pasteurizado entre doadoras nos estágios de lactação.	58
Figura 22 - Análise de componente principal. Leite maduro cru e pasteurizado.....	59
Figura 23 - Análise de componente principal. Leite transição.	60
Figura 24 - Análise de componente principal. Leite colostro.	60
Figura 25 - Análise de componente principal. Leite colostro e maduro.	61
Figura 26 - Método dos mínimos quadrados parciais para quantificar Kcal no leite humano.....	63
Figura 27 - Método dos mínimos quadrados parciais para quantificar Acidez no leite humano.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores que alteram a composição do leite humano.	18
Tabela 2 – Composição nutricional do leite humano em suas três fases.	19
Tabela 3 – Composição do leite humano no decorrer da mamada	20
Tabela 4 – Composição de proteínas e frações do colostro e leite maduro do leite humano	23
Tabela 5 – Composição de gorduras nas fases colostro, transição e maduro no leite humano	24
Tabela 6 - Composição nutricional do leite humano de minerais.....	25
Tabela 7 – Composição nutricional do leite humano de vitaminas	25
Tabela 8 – Composição nutricional de lactose nos estágios de lactação.....	26
Tabela 9 - Regiões espectrais do infravermelho.	44
Tabela 10 – Regiões espectrais do infravermelho e suas principais aplicações.	45
Tabela 11 - Descrição das doadoras.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abrinq	Cenário da Infância e Adolescência da Fundação ??????
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BLH	Banco de Leite Humano
C	Leite humano cru
cm	Centímetro
cm ⁻¹	Número de onda
°C	Graus Celsius
CV	Coefficiente de Variação
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organização para a Alimentação e Agricultura)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FT	Transformada de Fourier
FT-MIR	Infravermelho Médio por Transformada de Fourier
FTMIR–ATR	Infravermelho Médio por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada
g	Gramas
Kg	Quilograma
L	Litro
LH	Leite Humano
mg	Miligrama
MIR	<i>Mid Infrared</i> (infravermelho médio)
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde

P	Leite humano processado/pasteurizado
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
pH	potencial Hidrogeniônico
PNIAM	Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Humano
PT	Pré-termo
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RN	Recém-nascido
RNBLH	Rede Nacional de Banco de Leite Humano
SBP	Sociedade Brasileira de Pediatria
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
λ	Comprimento de Onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Importância do Aleitamento Humano	16
3.2 Composição do Leite Humano.....	18
3.2.1 Composição das Proteínas.	22
3.2.2 Composição Lipídica	23
3.2.3 Composição Mineral e Vitamínica	24
3.2.4 Composição de Carboidratos.	26
3.3 Caracterização Físico-química do Leite Humano	26
3.3.1 Determinação de Acidez	26
3.3.2 Determinação de pH.	27
3.3.3 Determinação de Densidade	27
3.4 Bancos de Leite Humano	28
3.5 Processamento do Leite Humano	30
3.5.1 Seleção e Classificação.....	30
3.5.2 Pasteurização.....	37
3.5.3 Congelamento	41
3.6 Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	43
3.6.1 Definições e aplicações.	43

	13
3.6.2 A Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio, Fourier (FT-MIR).	45
3.6.3 Reflectância Total Atenuada (ATR).	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Coleta das mostras	49
4.2 Histórico das doadoras	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Análises de espectros de infravermelho.....	54
5.2 Análises de componentes principais	58
5.2.1 Análises de componentes principais em amostras de leite: colostro, transição e maduro.	59
5.2.2 Análises de componentes principais para diferenciar as fases do leite.	61
5.2.3 Análises para quantificar as propriedades do leite.	61
6. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

O leite humano (LH), popularmente conhecido como leite humano, é produzido naturalmente pelo corpo da mulher e liberado pelo organismo, logo após o parto. Possui grande importância na alimentação do lactente, isso se deve ao fato dele ser, indiscutivelmente, o alimento mais completo e seguro que os bebês podem receber, contendo a função de proteção, atendendo nos aspectos nutricionais, fornecendo nutrientes, vitaminas e minerais de que eles precisam para o crescimento. É o único que contém anticorpos e outras substâncias que protegem as crianças de infecções comuns durante a fase de amamentação (LORENÇONI, . *et al.*, 2021; ANVISA, 2006). De acordo com os autores Ferreira *et al.*, (2017) vários motivos o tornam adequado para alimentação das crianças, como o favorecimento do ganho de peso, diminuição do risco de doenças, proteção imunológica, como consequência possibilitando a redução de mortalidade dessa faixa etária.

Apesar de ser rico em nutrientes, a sua composição nutricional sofre variações que dependem de vários fatores, como: estágio de lactação, parto prematuro, tempo de gestação, esvaziamento da mama, hora e intervalo entre as mamadas, grau de pressão utilizado para extrair o leite, método e horário de coleta das amostras, intervalo entre gestações e a ingestão de álcool ou drogas (ANVISA, 2008; LORENÇONI. *et al.*, 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS), o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e o Ministério da Saúde (MS) sugerem que o aleitamento humano deva ser exclusivo, até os seis meses de idade e, depois dessa idade, que os lactentes recebam alimentos complementares, mas que permaneçam com o leite humano até os dois anos ou mais. Contudo, em certas situações, algumas mães apresentam dificuldades para amamentar o filho, devido à infecção por vírus de imunodeficiência humana (HIV) ou por vírus linfotrópico T humano (HTLV), uso de medicamentos, insuficiência na produção, ou pelo fato do bebê nascer prematuro – com menos de 34 semanas de gestação – não conseguindo coordenar a “sucção-deglutição-respiração”, portanto, apresenta risco de aspiração. Além disso, ao realizar o movimento de sugar pode levar a um gasto excessivo de energia, fazendo com que a criança perca peso. Em lactentes prematuros a necessidade de nutrientes é ainda maior, isso se deve fato, do prematuro começar a vida, em um estado nutricional comprometido, com alto risco nutricional em decorrência de reservas precárias de nutrientes, imaturidade fisiológica, enfermidades e por muita demanda de nutrientes para o crescimento. A amamentação continua a ser o primeiro caminho de alimentação desses pacientes (KRAUSE, 2005; OMS, 2019). São poucas as opções para atender as necessidades nutricionais quando não se pode contar com a amamentação, LH doado e as

fórmulas infantis são as mais usadas para suprir a alimentação dos bebês. Segundo a OMS (2019), o leite humano doado, em comparação às fórmulas infantis, está associado à menor incidência de distúrbio intestinal grave, enterocolite necrosante e outras infecções durante a internação hospitalar inicial após o nascimento.

Nesses casos o leite coletado e processado em Bancos de Leite Humano (BLH) é utilizado com alternativa de alimentação segura, garantindo o desenvolvimento da criança. Para isso, inevitavelmente esse leite deve estar adequado aos quesitos de inocuidade e valor nutritivo (FAVARETTO, *et al.*, 2016). De acordo com a ANVISA (2006), o BLH deve ser um local especializado, responsável por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento humano e desempenho de atividades de coleta da produção láctea da nutriz, do seu processamento, controle de qualidade e distribuição. Todo Leite Humano (LH) recebido pelo BLH são submetidos a seleção e classificação, onde é verificada as condições da embalagem, a presença de sujidades, a cor, o *off-flavor*, a acidez Dornic e o conteúdo energético pela análise em crematócrito. Após essas etapas, realizam a pasteurização e análises microbiológicas indicativas de presença de coliformes totais. Esses processos são procedimentos obrigatórios pelos BLHs brasileiros, em virtude de identificar possíveis problemas no leite (FIOCRUZ, 2003; ANVISA, 2006). No caso de não preencherem as especificações determinadas devem ser descartados (ALMEIDA, J. A.G, 2008).

Dessa forma, antes de sua distribuição aos interessados, os BLHs aplicam tecnologias de conservação, como a pasteurização lenta, que consiste no tratamento térmico e resfriamento rápido do leite humano, com o propósito de diminuir a carga microbiana e eliminando possíveis microrganismos nocivos à saúde e a destruição do vírus HIV. Por outro lado, pode ocasionar alterações químicas e biológicas indesejáveis como redução de vitaminas hidrossolúveis, redução das propriedades imunológicas e a inativação de enzimas, sendo destruídos fatores essenciais do leite em maior ou menor grau, dependendo do seu termo resistências (LORENÇONI, M. F. *et al.*, 2021; SOUSA & SILVA, 2010; BORGIO, 2011; FAVARETTO, M. *et al.*, 2016).

Neste estudo pretende-se analisar a influência da pasteurização nos componentes de leite humano do Banco de leite localizado na cidade de Juiz de Fora (MG), sendo ele o primeiro do Brasil fora de um hospital maternidade, tornando-se referência na Zona da Mata e Vertentes. O local atua na coleta, pasteurização, análise e distribuição do leite, assim incentiva e apoia o aleitamento humano em todo município e região, tendo o foco de oferecer a captação e a doação do leite humano para o atendimento a recém-nascidos (RN) prematuros com baixo peso. Conta com uma equipe de profissionais que realizam campanhas de doação e criam postos de coleta

que contribuem para o aumento do número de doadoras (PREFEITURA DE JUIZ DE FORA, 2021).

Visto que o leite humano é indispensável na vida dos lactentes, viu-se a necessidade da avaliação da composição nutricional do LH ofertado pelo BLH de Juiz de Fora, para essa averiguação se optou por uma técnica simples e rápida – a espectroscopia na região do infravermelho médio. Este método não apresenta geração de resíduos, sendo capaz de promover a identificação, qualificação e quantificação de compostos orgânicos nos alimentos, a partir de um único espectro (CAMPESTRINI, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho consiste em estudar os macronutrientes (proteína, carboidrato e lipídeo) no leite humano cru e processado/pasteurizado do banco de leite localizado na cidade de Juiz de Fora, MG, através da espectroscopia no infravermelho médio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Analisar e caracterizar os espectros obtidos de leite cru e pasteurizado.

2.2.2. Diferenciar os três estágios de lactação: colostro, transição e maduro.

2.2.3. Quantificar as propriedades no valor calórico e na acidez nos três estágios de lactação: colostro, transição e maduro.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 IMPORTÂNCIA DO ALEITAMENTO HUMANO

O aleitamento humano traz benefícios de ser baixo custo e gerar o fortalecimento de laços afetivos, é uma prática fundamental para a promoção de saúde das crianças e a longa duração do aleitamento também contribui para a saúde e o bem-estar das mães, confere uma redução de problemas na saúde, como diminuição de chances de desenvolver câncer de mama e ovário, osteoporose e depressão pós-parto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Já para os recém-nascidos a amamentação ajuda na redução da mortalidade desta faixa etária, uma vez

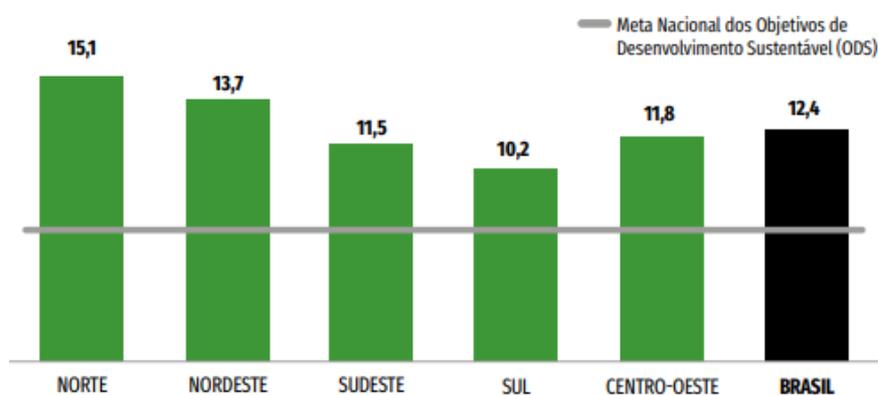
que o leite atua como fonte de nutrição, com a sua composição única garante água, macronutrientes e micronutrientes para o crescimento e desenvolvimento dos lactentes, além de atuar como proteção a patógenos (NUNES, 2015).

A mortalidade infantil é um dos principais indicadores que subsidiam a qualidade da saúde para gestantes e recém-nascidos menores de um ano, sendo que podemos associar o aleitamento humano com impacto na redução da mortalidade infantil, devido à diminuição de doenças, principalmente, de diarreias, infecções respiratórias, deficiência imunitária, alergias, problemas digestivos e demais enfermidades infectocontagiosas. Além de imunização, promoção da alimentação saudável, desenvolvimento maxilar e dentário, controle do índice de massa corporal (IMC) em lactentes e suplementação de vitaminas (NUNES, 2015; FUNDAÇÃO ABRINQ, 2021).

Segundo dados do Cenário da Infância e Adolescência da Fundação Abrinq (2021), a taxa de mortalidade infantil de menores de um ano é de 12,4 para cada 1.000 nascidos vivos, as causas são descritas como: causas reduzíveis por imunização e causas reduzíveis relacionadas à atenção básica do recém-nascido. Os resultados geram motivo de preocupação, uma vez que 65,8% dos óbitos de crianças menores de um ano poderiam ser evitados, sendo 54,6% por melhorias na assistência à mulher durante a gravidez, parto ou recém-nascido, 6,4% por meio de ações de tratamento e diagnóstico adequados e 4,8% por ações de promoção à Saúde.

Os indicadores mostram que o Brasil precisa enfrentar as mortes evitáveis de recém-nascidos, com o intuito de reduzir a taxa da mortalidade infantil, oferecendo mais assistências as gestantes e aos bebês. Quando se analisa por região, o cenário fica ainda mais alarmante: as regiões Norte e Nordeste superam a taxa nacional, conforme mostra a Figura 1.

Figura 1: Taxa de mortalidade infantil (menores de um ano de idade). Brasil e Grandes Regiões, 2019. Para cada mil nascidos vivos.



Fonte: Adaptado da FUNDAÇÃO ABRINQ, (2021).

Ao adentrarmos na prematuridade, dados do Ministério da saúde (2021) demonstram que o problema da prematuridade atinge 15 milhões de crianças todos os anos ao redor do mundo: 1 em cada 10 bebês nasce prematuro. Estima-se que no Brasil, 340 mil bebês nascem prematuros todo ano, o equivalente a 931 por dia ou a 6 prematuros a cada 10 minutos. Alguns sobrevivem graças ao avanço da neonatologia e criação das Unidades de Tratamento Intensivo Neonatal aliado a uma alimentação adequada, o que ressalta a importância do papel do BLH.

Segundo a UNICEF, o aleitamento humano, se realizado até seis meses, pode evitar, por ano, a morte de 1,3 milhão de crianças menores de 5 anos. Quanto maior o tempo de exposição do lactente a amamentação, maiores serão os benefícios nutricionais e imunológicos, em virtude da sua composição nutricional rica influenciar positivamente no crescimento e o desenvolvimento saudável dessa faixa etária.

3.2 COMPOSIÇÃO DO LEITE HUMANO

Com sua composição química balanceada, o leite humano pode ser considerado um alimento que supre todas as necessidades nutricionais do recém-nascido, contendo nutrientes essenciais, antimicrobianos, agentes anti-inflamatórios, enzimas digestivas, diversos tipos de hormônios, fatores de crescimento e imunomoduladores. No entanto, inúmeras condições modificam a sua composição, aumentando ou diminuindo o volume lácteo e a proporção de alguns nutrientes no leite ordenhado. Essas variações podem ser de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos. Onde os motivos intrínsecos estão intimamente ligados à produção láctea e os extrínsecos são decorrentes da manipulação, contudo, sem o processamento do leite em BLH não seria possível a oferta de LH as crianças que necessitam do produto (CALIL *et al.* 2011). Na Tabela 1 é possível observar os fatores que podem alterar a composição do leite.

Tabela 1: Fatores que alteram a composição do leite humano

Fatores Intrínsecos	Fatores Extrínsecos
Tempo de Lactação	Efeitos da refrigeração e congelamento
Tempo de Mamada (Início e Fim)	Contaminação por microrganismos
Rotina de Amamentação	<i>Flavor</i>
Idade	Acidez desenvolvida
Paridade Materna	Efeitos da Pasteurização
Estação do Ano	
Região	
Dieta Materna	

Diferenças Individuais
Estado Nutricional Humano
Idade Gestacional

Fonte: Adaptado de CALIL *et al.* (2011).

O estágio de lactação pode ser dividido em três fases: leite colostro, leite de transição e leite maduro. O colostro possui um aspecto mais viscoso, sendo disponível durante os primeiros dias de lactação, até entre o quinto e sétimo dia (CALIL *et al.*, 2011). Em sua composição podemos encontrar uma maior concentração de proteínas, minerais, vitaminas (principalmente A, E, e os carotenóides), uma menor porção de lactose, gorduras e vitaminas do complexo B (BALLARD; MORROW, 2013).

Como a maturação do leite ocorre aos poucos, temos o leite de transição, como o próprio nome diz, ele é produzido no período intermediário entre o colostro e o maduro. Em geral, esse leite é produzido entre o sexto e os 15º dias após o parto. Em sua composição existe uma diminuição do volume de proteínas, contudo é rico em gordura e lactose. O estágio final e definitivo do leite humano é o leite maduro, que contém todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento físico e cognitivo para o recém-nascido. Sua composição é um equilíbrio perfeito entre macronutrientes (proteínas, lipídios e carboidratos) e micronutrientes (vitaminas, como a vitamina A e C, e minerais, como ferro, cálcio e zinco) (UNICEF, 2020). A Tabela 2 traz a composição nutricional do leite humano nas fases de lactação.

Tabela 2: Composição nutricional do leite humano em suas três fases.

Componente	Colostro	Leite de Transição	Leite Maduro
Água	87,2 g/ Dl	86,4 g/ dL	87,6 g/ dL
Energia	58 kcal/ Dl	74 kcal/ dL	71 kcal/ dL
Sólidos totais	12,8 g/ Dl	13,6 g/ dL	12,4 g/ dL
Minerais	0,33%	0,24%	0,21%
Gorduras	1,85 a 2,9%	2,9 a 3,6%	3,0 a 3,8%
Lactose	5,3%	6,6%	7,0%
Proteínas Totais	2,7%	1,6%	1,2%

Fonte: Adaptado de CALIL *et al.* (2011).

A água apresenta aproximadamente 87,5% na composição do leite humano, quantidade suficiente para suprir as necessidades hídricas dos recém-nascidos, e ainda desempenha papel fundamental na regulação da temperatura corpórea. Nela estão solubilizados compostos nitrogenados não proteicos, carboidratos, minerais, fatores de proteção, vitaminas hidrossolúveis (MOURA, 2002).

As características nutricionais e físico-químicas ficam diferentes conforme a fase da mamada em que está sendo analisado. Na Tabela 3, é possível analisar a composição do LH no decorrer da mamada. De acordo com o UNICEF (2020), a composição não é constante, podendo mudar a cada mamada, principalmente no que diz respeito à proporção de gordura. Às vezes, ele é mais “ralo” e “aguado”, contendo importantes carboidratos, proteínas e vitaminas. Em outras ocasiões, é mais grosso, cremoso e, portanto, mais gorduroso.

Tabela 3: Fases do Leite Humano

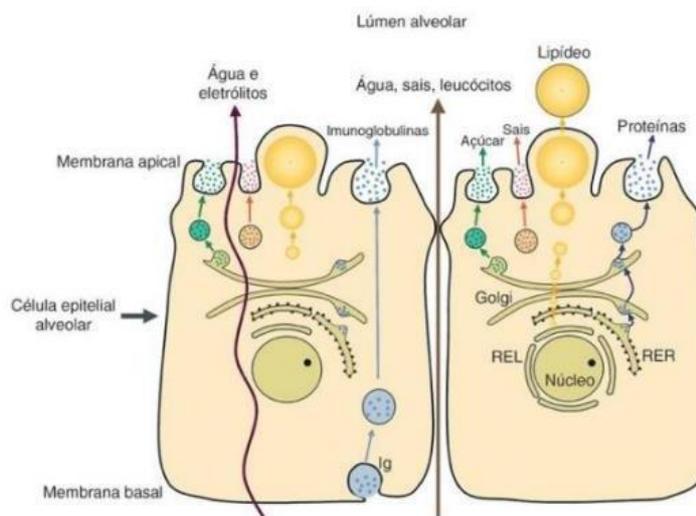
Fases	Fração Solução ou Aquosa	Composição de Nutrientes
Fase Inicial Colostro	Aspecto de água de coco, com coloração azul clara a esverdeada.	Proteínas do soro: Alfa-lactoalbumina, lactoferrina, IgA secretória. Lactose e Oligossacarídeos. Sais Minerais: Sódio, potássio, cloreto, cálcio, magnésio, fosfato e citratos. Vitaminas hidrossolúveis: Vitaminas do complexo B, niacina e ácido fólico. 95% dos fatores de proteção de ação local, correspondentes às proteínas do soro. Enzimas e Hormônios
Fase Intermediária Transição	Coloração branca- opaca, devido à presença de micelas de caseína e vitamina A	Proteínas – 20% correspondem à caseína. Micela de alfa, beta e kappa caseína. Fosfato coloidal e cálcio orgânico.
Fase Final Maduro	Coloração branco-amarelada, devido o predomínio de gorduras e de pigmentos lipossolúveis, como o beta caroteno.	Vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K). Lipídeos e ésteres (ácidos graxos livres e fosfolipídios de cadeia curta). Gorduras dispersas (Glóbulos envolvidos em membrana fosfolipoproteica) Colesterol 5% dos fatores de proteção, em especial, o fator antiestafilococos.

Fonte: Adaptado de CALIL *et al.*, (2011).

O leite humano é produzido por um complexo sistema neuroendócrino e permanece acumulado na glândula mamária antes da amamentação. O sistema neuroendócrino envolve primeiramente o desenvolvimento da mama e após lactogênese e lactopoese, onde a lactogênese é o início da produção de leite, acontecendo logo após o parto sobre comando do hormônio prolactina que é produzido pela hipófise. Quando se inicia a lactação (lactogênese) ela é mantida (lactopoese) pela existência do reflexo neuroendócrino da sucção do mamilo pelo lactente ou manipulação, que age no eixo hipotalâmico-hipofisário liberando os hormônios prolactina e ocitocina. A prolactina é responsável pela produção láctea (proteínas, caseínas, ácidos graxos, lactose), e a ocitocina pela descida e ejeção do leite. Resumindo a sucção do lactente desencadeia um reflexo hormonal que culmina com liberação de prolactina e ocitocina responsáveis pela produção, descida e ejeção do leite (MONTENEGRO; REZENDE FILHO, 2008).

A síntese do leite humano acontece nas células alveolares mamárias, como traz o esquema da Figura 2. As proteínas são formadas pela via secretória, onde são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e migram até o complexo de Golgi para serem empacotadas em vesículas secretórias. A lactose é secretada por exocitose após ser sintetizada pelo complexo de Golgi. Já as imunoglobulinas, importantes na resposta imune dos recém-nascidos, são endocitadas e atravessam a célula alveolar até a membrana basal, onde são secretadas para o lúmen. Na via dos lipídeos acontece a síntese dos ácidos graxos pelo retículo endoplasmático liso, formando gotículas que amplia de comprimento ao longo da migração em direção a membrana apical. Pela via transcelular ocorre a migração de água e eletrólitos por gradiente osmótico e eletroquímico. Finalmente temos, a via paracelular ocorre a migração de diversas substâncias e tipos celulares através das junções celulares durante a sucção (JONES & DECHERNEY, 2005).

Figura 2: Esquema das vias utilizadas na produção de leite pelas células alveolares.



Fonte: Adaptado de JONES & DECHERNEY, 2005.

A composição e volume de leite produzido sofrem variações, que alteram com o tempo de amamentação, com a hora do dia, e com o tempo de mamada (início e fim), de forma a se adaptar às características e a necessidades fisiológicas da criança. O volume resulta do quanto à criança suga e a frequência das mamadas. Uma nutriz que amamenta exclusivamente seu bebê, normalmente produz mais leite do que a necessidade de seu filho, chegando a 800 mL por dia no sexto mês de lactação (ANVISA, 2008; LORENÇONI, *et al.*, 2021).

Por possuir uma composição rica em nutrientes, o incentivo da amamentação é fundamental para a preservação da fase infantil com reflexos altamente positivos ao longo da vida adulta. As proteínas, os lipídios, os minerais e os carboidratos fazem do LH a alimentação adequada para os lactentes. A proporção da concentração entre esses componentes varia de acordo com o tempo de evolução da lactação.

3.2.1 Composição das Proteínas

A proteína (PTN) do leite humano tem importância para o crescimento e desenvolvimento dos recém-nascidos, fornecendo aminoácidos, conferindo proteção imunológica e desempenhando funções de desenvolvimento e regulatórias. O conteúdo médio de proteínas no LH no primeiro mês após nascimento é de 1,5g/100mL, em seguida ocorre uma redução para cerca de 1,3g/100mL, com variações de 1,13 a 2,07 g/100mL na concentração de proteínas (MOLINARI *et al.*, 2012; VINAGRE; DINIZ, 2001). Sendo que a necessidade de

proteína do RN de termo (aquele que nasceu entre a 37^a e a 41^a semana de gestação) é estimada em cerca de 2,0 a 2,5 g/kg/dia, decrescendo gradualmente até chegar a 1,3 g/kg/dia, por volta do quarto mês. Quando chega ao estágio de lactação de leite maduro, a média de fornecimento de proteína é de 1,2 g de proteína para cada 100 mL de leite (CALIL *et al.*, 2011).

Tabela 4: Composição de proteínas e frações do colostro, transição e leite maduro do leite humano.

Constituinte	Colostro (1 a 5 dias)	Transição (6 a 15 dias)	Leite Maduro (>30 dias)
Proteína total (g/dl)	2,7%	1,6%	1,2%
Caseína	1,2%	0,7%	0,25%
Lactoalbumina	-	0,8%	0,3%
Lactoglobulina	-	-	-

Fonte: Adaptado de CALIL *et al.*, (2011).

No teor proteico total, o soro constitui 60 a 90%, em sua composição estão incluídas a alfa-lactalbumina, a lactoferrina, a lisozima, a soro albumina, as imunoglobulinas. Já a beta-lactoglobulina está presente no leite humano somente quando a nutriz ingere o leite de vaca. A alfa-lactoalbumina é a principal proteína no soro do LH, constitui cerca de 40% das PTNs do soro, sendo necessária para o transporte de ferro e ainda para a síntese de lactose na glândula mamária. A lactoferrina, a lisozima, a soroalbumina, as imunoglobulinas são PTNs específicas do soro do LH envolvidas no sistema de proteção (CALIL *et al.*, 2011; VINAGRE & DINIZ, 2001).

O restante do teor proteico do leite humano é formado pela caseína, sendo constituída por um grupo de subunidades que tem a propriedade de formar micelas com o cálcio e fósforo, concedendo a aparência branca ao leite. As frações predominantes de caseína no LH são a beta-caseína (50%) e kappa-caseína (20 a 27%). A capacidade da caseína de formar micelas junto ao cálcio e fósforo favorece no transporte desses minerais em proporções maiores para as crianças (LEITE; FEFERBAUM, 2018).

3.2.2 Composição Lipídica

Os lipídios são fontes de energia e respondem por grande parte da reserva energética dos seres humanos, são componentes estruturais de tecidos, fontes de colesterol, servem de ligação para absorção das vitaminas lipossolúveis, dentre outros benefícios. O LH contém de 3 a 5 % de lipídios, sendo que 98% são triacilgliceróis, 1% de fosfolipídios e 0,5% de esteróis.

Eles são os macronutrientes que mais sofrem influência na sua concentração, as alterações ocorrem de acordo com o tempo de mamada, variação diurna, dieta materna e duração da lactação (LEITE, A. G. Z. & FEFERBAUM, R., 2018). No colostro a gordura apresenta o nível mais baixo de concentração e vai aumentando gradativamente com o tempo de lactação. A Tabela 5 traz o teor de gordura no leite humano em diferentes fases de lactação.

Tabela 5: Composição de gordura nas fases colostro, transição e maduro no leite humano.

Constituinte	Colostro (1 a 5 dias)	Transição (6 a 15 dias)	Leite Maduro (>30 dias)
Gordura	1,85 a 2,9%	2,9 a 3,6%	3,0 a 3,8%

Fonte: Adaptado de CALIL *et al.*, (2011).

Para os autores Lamounier, Vieira e Gouvêa (2009) a dieta materna influencia da seguinte forma no leite: se a dieta da nutriz for rica em gordura animal, os ácidos graxos saturados estarão presentes em maior quantidade. Caso a dieta seja baseada em gordura de origem vegetal, o ácido linoleico e seus derivados poli-insaturados apresentam maior quantidade.

Segundo KOLETZKO (2017), os lipídios do leite humano demonstraram efeitos biológicos importantes fornecidos aos bebês, por exemplo, na função gastrointestinal, na composição e função da membrana, crescimento infantil, neuro desenvolvimento e na função imunológica. A ingestão média dos lactentes totalmente amamentados chegam a 21,42g/dia entre o nascimento e os seis meses de idade. Isto resulta em aproximadamente 3,9 kg de lipídios fornecidos durante o primeiro semestre de vida.

3.2.3 Composição Mineral e Vitamínica

Os minerais possuem relevância para o crescimento, o desenvolvimento e a manutenção da saúde dos tecidos corporais. No LH constam o sódio, potássio, cloreto, cálcio, magnésio e fósforo. As variações nos níveis desses macronutrientes podem ocorrer, devido o tempo de lactação, como por exemplo, com passar dos meses de lactação, os conteúdos de sódio e cloreto diminuem, enquanto que o cálcio, fósforo e magnésio aumentam. A quantidade de minerais disponíveis no leite humano é suficiente para o crescimento adequado, sem sinais de deficiência ou alterações esqueléticas nos recém-nascidos (QUINTAL & CALIL, 20018).

Tabela 6: Composição nutricional do leite humano de minerais.

Mineral	Colostro	Leite de Transição	Leite Maduro
Sódio	21 mEq/L	13 mEq/L	7 mEq/L
Potássio	19 mEq/L	16 mEq/L	14 mEq/L
Cálcio	31 a 32 mg/ dL	29 a 34 mg/ dL	28 a 33 mg/ dL
Fósforo	12 a 14 mg/ dL	15 a 17 mg/ dL	13 a 15 mg/ dL
Magnésio	3 a 4 mg/ dL	2,7 a 4 mg/ dL	3 a 4 mg/ dL
Zinco	0,50 a 0,96 mg/ dL	0,32 a 0,46 mg/ dL	0,25 a 0,37 mg/ dL
Ferro	0,09 mg/ dL	0,04 mg/ dL	0,07 a 0,15 mg/ dL
Cloreto	26 mEq/L	15 mEq/L	12 mEq/L

Fonte: Adaptado de CALIL *et al.* (2011).

Vários fatores influenciam no conteúdo vitamínico do leite humano, sendo mais relevante o estado nutricional humano, quando a dieta materna é baixa em vitaminas, os níveis lácteos são baixos também, quando a dieta materna é alta, as concentrações lácteas ficam em um valor máximo constante, evitando assim a suplementação. Com a dieta e com o peso gestacional adequado, as gestantes parecem possuir, ao nascimento, reservas suficientes de vitaminas, com possível exceção da Vitamina K. O LH pode fornecer todas as necessidades vitamínicas, desde que sejam ingeridos 750 a 1000 mL por dia (CALIL *et al.*, 2011).

Tabela 7: Composição nutricional do leite humano de vitaminas.

Vitaminas	Colostro	Leite de transição	Leite Maduro
Vit. A	161 mg/ dL	88 mg/ dL	53 mg/ dL
Carotenoides	137 mg/ dL	38 mg/ dL	27 mg/ dL
Vit. B1	1,9 mg/ dL	5,9 mg/ dL	16 mg/ dL
Vit. B2	30,2 mg/ dL	36,9 mg/ dL	43 mg/ dL
Vit. C	7,2 mg/ dL	7,1 mg/ dL	4,30 mg/ dL
Vit. D	*	*	0,4 a 10,0 UI/dL
Vit. E	1,5 mg/ dL	0,68 mg/ dL	0,46 mg/ dL
Vit. K	*	*	1,5 mg/ dL

*Dados não disponíveis. Fonte: Adaptado de CALIL *et al.* (2011).

3.2.4 Composição Carboidratos

A fração de carboidrato é composta pela lactose (87%), os oligossacarídeos (12%), com baixas concentrações de monossacarídeos livres (1%). A concentração de lactose no colostro oscila ao redor de 5,3 g/dL, elevando-se para 7 g/dL no leite maduro, fornecendo de 45 a 50% do conteúdo energético total do leite humano. Outros açúcares são encontrados, em menor concentração, como a glicose, glicoproteínas, oligossacarídeos (prebióticos) e a

galactose (importante no metabolismo de glicolípídeos com atuação no sistema nervoso central (CALIL *et al.*2011).

Tabela 8: Composição nutricional de lactose nos estágios de lactação.

Constituinte	Colostro (1 a 5 dias)	Transição (6 a 15 dias)	Leite Maduro (>30 dias)
Lactose	5,3%	6,6%	7,0%

Fonte: Adaptado de CALIL *et al.*, (2011).

A lactose é um dissacarídeo que estimula atividade endógena da enzima lactase no aparelho digestivo, tendo como principal função a hidrólise da lactose em glicose e galactose durante a digestão. Os principais efeitos fisiológicos no trato gastrointestinal são: amolecimento de fezes, estímulo da microbiota bacteriana não patogênica, melhor absorção intestinal de cálcio e ferro e promove a colonização intestinal com *Lactobacillus*, bactérias fermentativas que promovem meio ácido no trato gastrintestinal inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, fungos e parasitas (BARRETO; FUJII, 2019).

A ordenha do leite desde a coleta até a distribuição precisa ser oriunda de boas práticas, mantendo a qualidade nutricional e imunológica do leite, que provem através de procedimentos higiênicos sanitários adequados, deste modo mantendo o valor nutritivo e suas propriedades físico-químicas.

3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE HUMANO

3.3.1 Determinação de Acidez

Os BLHs têm grande a responsabilidade de fornecerem aos bebês um leite oriundo de outras mães, sem gerar nenhum risco para a sua saúde, assim é necessária adoção de práticas visando garantir a qualidade do leite recém-ordenhado, sendo o controle da sua acidez uma delas. A acidez em graus Dornic do leite humano é a acidez titulável do leite humano ordenhado, expressa em °D (ANVISA, 2006). Assim, sua acidez total pode ser considerada original, quando os valores oscilam de 1° a 4° D, resultando da presença dos próprios constituintes do leite, como micelas de caseína e sais minerais, fosfatos, citratos e os ácidos graxos. À medida que a microbiota encontra condições favoráveis para o crescimento, se torna a acidez considerada desenvolvida, devido à produção de ácido lático, a partir da fermentação

da lactose por bactérias mesófilas, conseqüentemente promovendo a elevação da acidez (SUCENA; FURLAN, 2008; FIOCRUZ, 2003).

Nos BLHs as amostras de leite tituladas com acidez inferior a 8 °D são novamente envasadas para posterior pasteurização e aquelas que se encontram acima de 8°D, realiza-se o descarte (FIOCRUZ, 2003). Esse processo ocorre devido à acidez titulável estar interligada com elevadas contagens de microrganismos.

3.3.2 Determinação de pH

O pH do leite humano pode ser considerado levemente alcalino, ficando em torno de 7,0, dependendo de propriedades importantes, como a estabilidade da caseína, que depende da acidez do leite. Quando o leite não é bem conservado após a coleta, ocorre um aumento progressivo da acidez, e essa, por sua vez, pode desestabilizar as micelas de caseína. Com o aumento na acidez, as ligações dentre caseína e cálcio são rompidas e o cálcio se torna menos disponível.

Em uma pesquisa realizada pelos autores Covas *et al.* (2000) demonstraram que o leite cru, conservado sob refrigeração (4°C) por quatro dias, passa por reações lipolíticas e proteolíticas, as quais liberam ácidos graxos e aminoácidos livres, proporcionando o abaixamento do pH. Também Galhardo *et al.* (2002) sugeriram que a acidez titulável não está somente relacionada com a qualidade higiênico-sanitária, mas à oxidação lipídica que ocorre durante o armazenamento.

3.3.3 Determinação de Densidade

A densidade é uma constante física importante na verificação da qualidade do leite, sendo relacionada com a riqueza do leite em sólidos totais. O valor da densidade do leite humano é de aproximadamente 1,03 g/ml (INSTITUTE OF MEDICINE, 1991).

3.4 BANCOS DE LEITE HUMANO (BLHs)

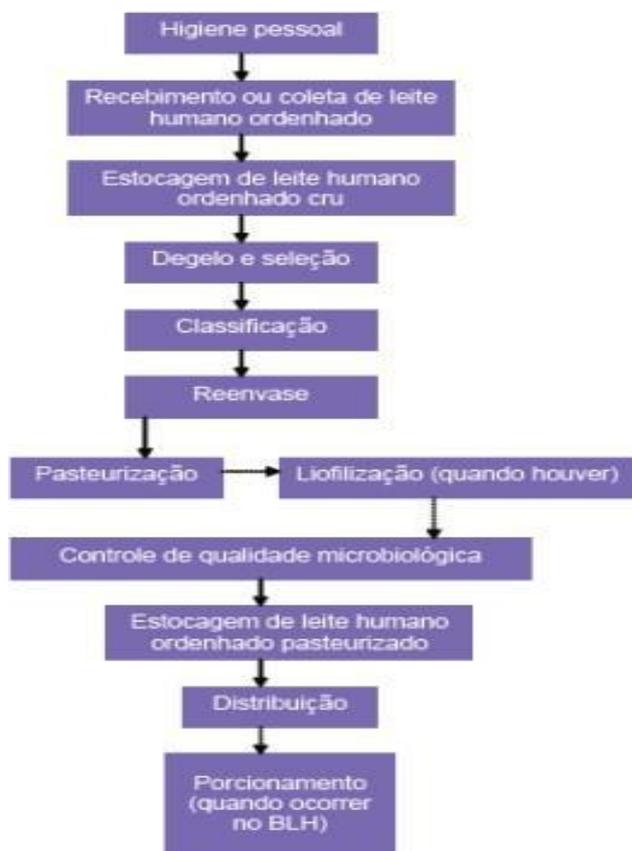
A história do banco de leite humano no Brasil se iniciou em 1943 quando foi constituído o primeiro banco de leite humano, no então Instituto Nacional de Puericultura, atual Instituto Fernandes Figueira, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Tinham como objetivo a coleta e a distribuição do leite atendendo casos considerados especiais, como prematuridade,

distúrbios nutricionais e alergias a proteínas heterólogas. O LH era visto como recurso soberano, não por suas características nutricionais, entretanto por suas propriedades farmacológicas, destinando-se a situações de emergência, quando o leite artificial não atendia aos recém-nascidos (ALMEIDA, J. A. G, 2008; HECK, A. R, 2007).

Existiu um período entre 1943 a 1985, em que os BLHs no Brasil, defendiam estratégias questionáveis, como por exemplo, a adoção que não provinha de um processo voluntário e consciente, como no momento atual, que depende única e somente da solidariedade humana. Na época chamada de medicina higienista, houve a comercialização do leite humano. Alguns Bancos de leite chegaram a remunerar as mães de acordo com o volume de leite produzido, nesse período o LH se transformou em um produto nobre, escasso, difícil de ser obtido, sendo oferecido por um preço elevado. Com o desenvolvimento do Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Humano em 1981, os BLHs foram reestruturados assumindo uma nova função para a saúde pública (ALMEIDA, J. A. G, 2008; HECK, A. R, 2007).

No início dos anos 1980, foram estabelecidas algumas unidades no Brasil, a partir de 1985, existiu uma verdadeira expansão, com a instituição de 47 novos serviços que, somados às 56 implantações ocorridas na década de 1990, passaram a totalizar 104 unidades em funcionamento no país (BRASIL, 2020). Em 2006 com a expansão dos bancos e dos postos de coleta, viram-se a necessidade da publicação de uma nova legislação, a RDC/ ANVISA nº171/2006, trazendo informação, capacitando e norteando gestores e profissionais, garantindo o funcionamento seguro e eficaz dos BLHs no país, assim, assegurando ser a primeira opção na alimentação dos recém-nascidos (ALMEIDA, 2008). Nos dias atuais, o Brasil é referência internacional, em a doação de leite. Isso porque a Rede de Banco de Leite Humano é a maior e mais complexa do mundo, contando com 224 bancos e 216 postos de coleta presentes em todo país (BRASIL, 2020). A Figura 3 representa o fluxograma do funcionamento de um BLH.

Figura 3: Fluxograma do funcionamento de um banco de leite humano.



Fonte: Adaptado de ANVISA, (2008).

Existem programas nacionais e internacionais que movimentam e incentivam o aleitamento humano, contudo, sabe-se que, ainda hoje, o desmame precoce acontece, gerando problemas graves de saúde pública. Há algumas alegações para a interrupção da prática da amamentação, como, por exemplo, os altos índices de desemprego, que força as mulheres a participarem do orçamento familiar, o retorno da mulher ao mercado de trabalho, surgimento das indústrias produtoras de fórmulas infantis, falta de informação da importância do aleitamento, questões como, popularmente se falam: “o leite é fraco e não sustenta”, a “criança chora muito”, a introdução precoce da alimentação, dentre outros fatores (BORGHO, 2011).

O banco de leite humano do estudo, foi inaugurado em Juiz de Fora no ano de 1991, fomenta e promove ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento humano, além de executar atividades de coleta do leite humano, seleção, classificação, processamento, controle de qualidade e distribuição. O local, conta com a ajuda do leite de mulheres doadoras em Juiz de Fora e região, conseguindo atender crianças que por algum motivo não conseguiram amamentar, essencialmente bebês prematuros, através de pedidos médicos encaminhados por

hospitais particulares, principalmente os hospitais públicos localizados na Zona da Mata (OLIVEIRA, 2010).

Possui seis pontos de coleta conveniados, sendo três pertencentes ao município de Juiz de Fora: Santa Casa de Misericórdia, Hospital Maternidade Therezinha de Jesus e Hospital Regional Dr. João Penido e três municípios de Barbacena, São João Del Rei e Leopoldina. O BLH de Juiz de Fora ainda exerce o papel educativo e social, sensibilizando a sociedade e os profissionais de saúde sobre a importância da amamentação e da doação de leite humano, através de campanhas, palestras e cursos oferecidos de forma gratuita (OLIVEIRA, 2010). Quanto à distribuição, são levados em consideração os critérios: recém-nascido, pré-termo ou de baixo peso, que não consegue realizar a sucção, RN infectado, RN em nutrição trófica, RN portador de imunodeficiência, RN portador de alergia a proteína heteróloga e casos excepcionais, a critério médico.

Nos dias atuais o objetivo de todos BLHs se dá em prestar assistência às mães doadoras e às mães com dificuldade de amamentação. Fornecendo LHO pasteurizado aos prematuros e recém-nascidos de baixo peso e doentes (HECK, 2007). O aleitamento humano é a escolha ideal para todos os bebês, devido a sua completa composição nutricional, que garante o crescimento e desenvolvimento saudável das crianças.

Para a segurança dos leites doados, os BLHs submetem os alimentos aos procedimentos de seleção e classificação, com o intuito de garantir o processamento de qualidade do alimento.

3.5 PROCESSAMENTO DO LEITE HUMANO

3.5.1 Seleção e Classificação

Atender as necessidades de um recém-nascido é uma tarefa que exige bastante cautela, devido aos perigos já apresentados nessa pesquisa. Dessa forma os BLHs precisam executar todas as atividades visando à redução, prevenção e diminuição dos riscos físicos, químicos e biológicos no Leite Humano Ordenhado (LHO). Os fatores ambientais são difíceis de serem controlados, mas é necessário garantir que as características internas dos produtos sejam preservadas, por isso, criaram-se indicadores que pudessem ser utilizados por todos BLHs, sendo eles: o período pós-parto, a data da coleta, avaliação da temperatura, ocorrência de sujidades, cor do produto, presença de *off-flavor*, acidez Dornic e determinação do conteúdo energético (NOVAK & ALMEIDA, 2011; FIOCRUZ, 2003; ANVISA, 2006).

Para realizar a doação do LHO a doadora passará por um cadastro no BLH, contendo informações como a idade gestacional no momento do parto e a idade da lactação em dias em que o leite foi coletado, com esses dados, o BLH consegue classificar o leite em colostro, período menos de sete dias após o parto, leite de transição sete a 14 dias após o parto, leite maduro mais de 14 dias após o parto e o leite de mãe de prematuro, com idade gestacional inferior a 37 semanas (ALMEIDA, J. A. G., 2008).

O leite ordenhado pelas doadoras, chamado de leite cru, é armazenado em congelamento logo após a ordenha, esse processo é uma forma preventiva para a preservação da qualidade do leite humano ordenhado, uma vez que impede a multiplicação dos microrganismos e mantém a integridade da estrutura do leite, deste modo impedindo o crescimento da microbiota capaz de promover alterações na composição. O acompanhamento da cadeia de frio observa a preservação da qualidade do leite humano ordenhado (NOVAK & ALMEIDA, 2011; ANVISA, 2006). A Figura 4 mostra o congelamento do leite humano cru no banco de leite de Juiz de Fora.

Figura 4: Congelamento do leite humano cru no banco de leite de Juiz de fora.



Fonte: Elaboração Própria.

Em seguida, esse leite é descongelado em banho-maria sobre temperatura controlada entre 40°C a 45°C e novamente resfriado em uma temperatura inferior a 5°C, para então passar pelas etapas de seleção e classificação e análises físico-químicas. A Figura 5 mostra o momento de descongelamento do leite humano cru no banho-maria do estudo. Em todo processo a

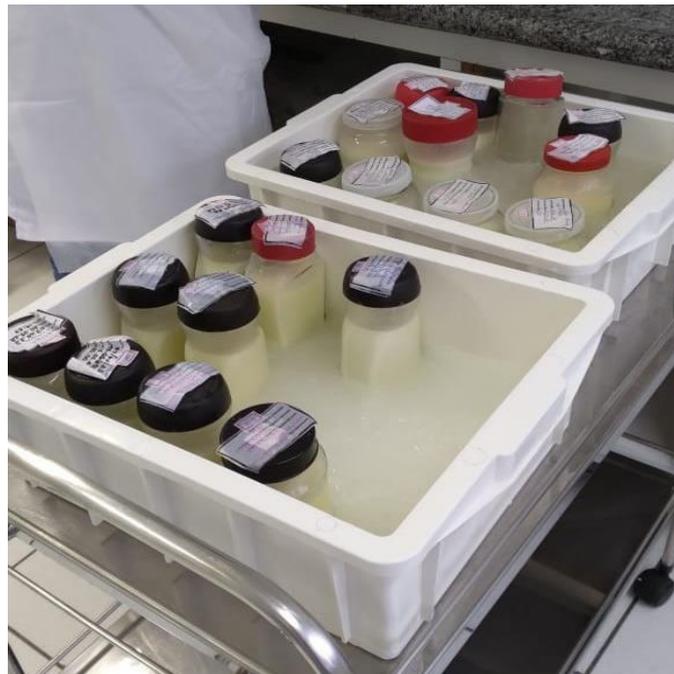
temperatura do leite é controlada de maneira que não traga riscos microbiológicos, assim novamente o LHOC – Leite Humano Ordenhado Cru é resfriado, como pode ser visto na Figura 6.

Figura 5: Descongelamento do leite humano no Banco de Leite de Juiz de Fora.



Fonte: Elaboração Própria.

Figura 6: Resfriamento do leite humano, após o descongelamento no Banco de Leite de Juiz de Fora.



Fonte: Elaboração Própria

A cor do LHO pode sofrer variações conforme os constituintes, geralmente o colostro possui a cor semelhante à água de coco ao amarelo-alaranjado, após duas semanas, com o leite de transição, a tonalidade altera para um azulado/opaco até se tornar o leite maduro, nesse estágio da lactação, diversos fatores podem mudar a cor do leite, entre eles a dieta materna e o uso de medicações, como por exemplo, no uso de corantes e no consumo de algumas bebidas (FIOCRUZ, 2003).

O momento que é realizado a ordenha também interfere na coloração, na fase inicial da ordenha, existe o predomínio da fração hidrossolúvel, em função disso, o produto tende de assumir uma cor tipo “água de coco”, podendo chegar a um azul ou verde intenso, devido à riboflavina. Na fase intermediária da ordenha, eleva a concentração da proteína caseína, resultando em um leite branco-opaco. Na fase final da ordenha, aumenta os constituintes lipossolúveis, por essa razão, tende a cor amarelada. Essas alterações na cor do LHO são modificações comuns, assim não configuram situações de não conformidade. A verificação da cor do LHO é importante para identificar a presença de sangue, quando existente no leite sua tonalidade oscila entre o “vermelho-tijolo” e o marrom-escuro, o que representa uma situação de não conformidade para a realização da doação. Essa contaminação com sangue surge, devido a uma descarga papilar (saída de secreção pelo mamilo), comum nas primeiras semanas de puerpério, ou devido a lesões, do tipo fissuras no mamilo (FIOCRUZ, 2003; NOVAK & ALMEIDA, 2011).

A verificação das sujidades tem como objetivo determinar prováveis alterações que irão caracterizar o LHO como indevido para consumo, a presença de um corpo estranho como: pêlos, cabelo, restos de alimentos, unha, insetos, papel, borracha, vidro entre outras substâncias, caracteriza como uma não conformidade, assim todo o conteúdo do frasco doado em que se encontrou a sujidade precisará ser descartado (NOVAK & ALMEIDA, 2011).

O termo *off-flavor* remete uma característica anormal que surge no LHO pela sua decomposição e/ou contaminação microbiana, gerando o aparecimento de odores indesejáveis. A presença de *off-flavor* é analisada no momento da seleção e classificação, com o intuito de detecção da qualidade do produto. Os odores que impedem a adoção, que são considerados impróprios para consumo, possuem odor semelhante ao de cloro, plástico, borracha, remédio, sabão de coco, peixe, ovos em decomposição e ao de coalhada, devido à fermentação da lactose, neste caso deve ser confirmado pela elevação da acidez no leite (NOVAK & ALMEIDA, 2011). A Figura 7 representa o momento de seleção e classificação (verificação da ocorrência de sujidades, cor do produto e presença de *off-flavor*) do leite humano do Banco de Leite de Juiz de Fora.

Figura 7: Seleção e classificação do leite humano do Banco de Leite de Juiz de Fora.



Fonte: Elaboração Própria.

A acidez Dornic do LHO é a acidez titulável expressa em graus do Dornic (ANVISA, 2006). Podendo ser classificada como original e desenvolvida, onde a original é resultado da presença dos próprios constituintes do leite, como micelas de caseína e sais minerais, fosfatos, citratos e os ácidos graxos. A desenvolvida resulta do crescimento bacteriano da microbiota, com produção de ácido lático, a partir da fermentação da lactose por bactérias mesófilas. A acidez titulável desenvolvida também poderá ser por consequência de outros fatores, como as técnicas inadequadas de coleta, a falta de higiene da doadora e dos utensílios utilizados e a manutenção do leite fora da cadeia do frio. Desse modo, como efeito, haverá o aumento da acidez do leite humano, reduzindo os componentes nutricionais e imunológicos presentes no produto, desqualificando-se para o consumo (SUCENA & FURLAN, 2008).

Valores de acidez entre 1 e 4°Dornic são considerados normais e originais do leite, mas à medida que a microbiota consegue condições favoráveis para o crescimento, ocorre a produção de ácido lático, consequentemente elevando a acidez. Se esta for maior que 8,0 °Dornic, o produto está desqualificado para o consumo (FIOCRUZ, 2003). A Figura 8 mostra a realização da análise de acidez Dornic no leite humano do Banco de Leite de Juiz de Fora.

Figura 8: Análise de acidez Dornic no leite humano do Banco de Leite de Juiz de Fora.



Fonte: Elaboração Própria.

A determinação do conteúdo energético ocorre através da técnica analítica crematócrito (ANVISA, 2006). Faz parte do controle de qualidade de rotina dos BLHs no que diz respeito ao controle físico-químico, permitindo a determinação do teor de creme (obtida da centrifugação do leite, constituída pela gordura empacotada, envolvida por uma membrana fosfolipídica), que permite o cálculo de gordura e do conteúdo energético do LHO (ALMEIDA, et al., 2011). A Figura 9 traz análise de crematócrito realizada no local do estudo.

Figura 9: Análise de crematócrito no leite humano do Banco de Leite de Juiz de Fora.



Fonte: Elaboração Própria.

O reenvase do LHO é o momento em que ocorre a transferência do leite humano cru do recipiente em que foi colocado depois da extração pela doadora, para o recipiente onde será pasteurizado. A Figura 10 ilustra o reenvase do leite cru para o vasilhame em que ocorrerá a pasteurização.

Figura 10: Reenvase do leite cru para o recipiente em que ocorrerá a pasteurização.



Fonte: Elaboração Própria.

Além desses indicadores que visam à redução, a prevenção e a diminuição de perigos no leite humano dos BLHs, os leites coletados de doação também passam pelo o processo de pasteurização e o do congelamento, que são procedimentos importantes para a manutenção da qualidade microbiológica do leite.

3.5.2 Pasteurização

Existem alguns microrganismos que podem contaminar o leite, por consequência de procedimentos inadequados de manuseio e higiene no momento da ordenha ou devido à mastite clínica, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e bactérias do gênero *Streptococcus* e *Salmonella* ssp. Há uma preocupação quanto à exposição dos lactentes a essas bactérias pelo fato de serem causadoras de doenças como sepsse neonatal, meningite e doenças diarreicas, principalmente em bebês prematuros e imuno comprometidos. Assim, o LHO destinado ao consumo de recém-nascidos, não deve apresentar microrganismos em quantidade capazes de trazer agravos à saúde. Dessa maneira, é necessário que os BLHs utilizem de processos biotecnológicos que aumentam a validade e garantem a

segurança do LHO, esses procedimentos são capazes de assegurar a qualidade sanitária do leite (ALMEIDA, 2008).

A fim de se garantir a qualidade microbiológica do LH oferecido aos recém-nascidos, se faz necessário a aplicação de uma tecnologia para inativação dos microrganismos patogênicos que possam estar presentes no leite. A pasteurização lenta é o procedimento padrão utilizado nos BLHs, que consiste em um tratamento térmico aplicável ao leite ordenhado cru, após aprovado pelo controle de qualidade, a uma temperatura de 62,5 °C por 30 minutos (SOUSA; SILVA, 2010; BORGIO, 2011). A Figura 11 mostra a pasteurização do leite humano realizada no Banco de Leite de Juiz de Fora. Após a pasteurização o leite é imediatamente resfriado, esse procedimento é importante para evitar a multiplicação de microrganismos que podem ter resistido ao processo de pasteurização.

A Figura 12 traz a imagem do resfriamento com temperatura controlada do leite humano, logo após a pasteurização. Segundo a ANVISA (2006), que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de BLH, o LH após pasteurização deve apresentar ausência de microrganismos do grupo coliformes. Quando há ausência desse grupo, indica eficiência no processo térmico, pois esses microrganismos são sensíveis a altas temperaturas.

Figura 11: Pasteurização do Leite Humano no Banco de Leite de Juiz de Fora.



Fonte: Elaboração Própria.

Figura 12: Resfriamento do leite humano após a pasteurização.



Fonte: Elaboração Própria.

Durante o processo de pasteurização, ocorre a homogeneização manual, visando a fragmentação dos glóbulos de gordura em tamanhos uniformes para evitar a sua coalescência e formação da nata, o que gera problema para a obtenção de um produto mais homogêneo, além do risco de contaminação por microrganismos, pela a intensa variação de temperatura local. (CARVALHO, 2008).

Alguns estudos têm apontado que a pasteurização destrói em maior e menor grau os fatores de proteção e os nutrientes presentes no LH, dependendo de suas termorresistências (BORGIO, 2011; BRAGA & PALHARES, 2007). Os autores Braga e Palhares (2007) verificaram que após a pasteurização do leite humano houve uma diminuição da concentração média da atividade da imunoglobulina IgA, para 64% em relação a sua atividade inicial. Constataram também que o leite humano pasteurizado poderia suprir as necessidades recomendadas para os nutrientes de sódio, potássio, magnésio, proteína, gordura e lactose, porém não atingiu a recomendação para cálcio e fósforo.

Já a pesquisadora Heck (2011) alega que o tratamento da pasteurização é um método suave que dá origem de poucas modificações, em geral, a cor e o sabor permanecem invariáveis, bem como os nutrientes, proteínas, os hidratos de carbono e os lipídios, ocorrendo uma perda dos fatores de proteção termossensíveis. Em um estudo realizado pelos autores Lorençoni *et al.* (2021), não encontram valores significativos de alteração de atividade antioxidante após a pasteurização, o leite pasteurizado permaneceu próximo ao leite cru ordenhado na composição

final, de acordo com a prática utilizada e recomendada pelos bancos de leite. A pasteurização é necessária para proteger o recém-nascido que receberá o leite, através deste processo térmico há eliminação de possíveis patógenos e da eliminação completa do vírus do HIV (ALMEIDA, J. A. G., 2008; LORENÇONI, M. F. *et al.* 2021).

Visto que esse processo apresenta efeitos benéficos em relação à redução da carga microbiana, porém pode modificar a sua composição nutricional, estrutural e biológica, ocasionar a quebra das moléculas de lipídios e a desnaturação de proteínas (VIEIRA *et al.*, 2011).

Devido a isso, algumas pesquisas vêm sendo realizadas em parceria com os BLHs para o desenvolvimento de outras técnicas que contribuam para a inativação microbiana, melhorando a preservação do LH em relação a sua composição química e estrutural, como o processamento em Altas Pressões Hidrostáticas (APH), considerado uma alternativa à pasteurização, é responsável por eliminar os microrganismos patogênicos do LH, por um período de 5 a 10 minutos, por ser rápido e não envolver temperaturas elevadas, esse processo elimina patógenos e preserva as características nutricionais, sensoriais e a composição química original do alimento (ARSLANOGLU *et al.*, 2013). Outras técnicas também estão sendo adotadas pela indústria de alimentos, como por exemplo, aquecimento ôhmico (AO) e ultrassom (US), visando diminuir os efeitos negativos promovidos pelo tratamento térmico convencional (FALCÃO *et al.*, 2021).

Com relação à pasteurização tradicional, não se pode considerar que ela elimina todos os microrganismos, entretanto permite, parcialmente, a manutenção das propriedades bacteriostáticas no leite. Por esse motivo, o processo de resfriamento e congelamento deve ser rigorosamente sequenciado para evitar que os microrganismos sobreviventes desenvolvam-se no leite em virtude de seus nutrientes (BORGIO, 2011). Ainda com o objetivo de garantir a qualidade, sob o ponto de vista microbiológico, do alimento distribuído. Os Bancos de Leite Humano, realizam testes simplificados para detecção de coliformes totais, a técnica consiste no inóculo de quatro alíquotas de 1 mL cada, pipetadas de forma independente, em tubos com 10 mL de Caldo Verde Brilhante (BGBL) a 5% p/v, com tubos de Durham em seu interior (ALMEIDA *et al.*, 2011). A Figura 13 mostra o teste sendo realizado no banco de leite do estudo.

Figura 13: Teste simplificado para detecção de Coliformes Totais no banco de leite de Juiz de Fora.



Fonte: Elaboração Própria.

3.5.3 Congelamento

Antes de serem administrados aos recém-nascidos, os leites humanos fornecidos pelos BLHs são submetidos a um complexo processo: pré-estocagem, descongelamento, pasteurização, novo congelamento, novo descongelamento e aquecimento (VIEIRA, *et al.*, 2004). O leite humano ordenhado cru e o pasteurizado devem ser estocados sob congelamento (ANVISA, 2006). A estocagem do LH em congelamento é uma das técnicas mais aplicadas na conservação deste produto, uma vez que as baixas temperaturas retardam a ocorrência de reações enzimáticas e químicas indesejáveis. A finalidade do congelamento é prolongar a vida útil, sendo excelente método de preservação dos nutrientes, por exemplo, a oxidação de lipídeos (HECK, 2011). A figura 14 mostra o congelamento do leite pasteurizado no banco de leite do estudo.

Figura 14: Congelamento do leite pasteurizado no banco de leite do estudo.



Fonte: Elaboração Própria.

Alguns estudos têm avaliado a estabilidade lipídica durante o armazenamento do LH (BERTINO *et al.*, 2013; GARCÍA-LARA *et al.*, 2013; GARCÍA-LARA *et al.*, 2012). García-Lara *et al.* (2013) observaram redução de 2,8% do teor de gordura, devido à dificuldade de amostragem, adesão em vidrarias, etc., no LH pasteurizado congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 180 dias comparado ao LH pasteurizado sem acondicionamento, sendo que se somando o efeito da pasteurização com o congelamento houve diminuição de 6,5% do teor de gordura inicial. Em outra pesquisa, García-Lara *et al.* (2012) observou também diminuição no conteúdo de gordura com queda máxima no período de 0 a 7 dias (0,027 g/dL por dia) após congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 90 dias.

Em outro estudo, Vázquez-Román *et al.* (2014) encontraram redução no teor de gorduras totais em LH cru e pasteurizado após congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O LH cru teve seu teor diminuído em todos os momentos analisados neste estudo (7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias), sendo que ao final dos 3 meses, os autores observaram decréscimo de 0,37 g/dL (11,59%) do teor de gordura inicial. Quanto ao LH pasteurizado congelado nas mesmas condições e 28 tempos, Vázquez-Román *et al.* (2014) observaram redução apenas até o primeiro mês, sendo esta equivalente a 0,39 g/dL (15,06%). Este mesmo autor explica que o congelamento não impede

a ação da lipase e também afeta o glóbulo de gordura. Gao *et al.* (2019) em sua revisão constataram que o armazenamento e a pasteurização provocam diminuições pequenas no teor de gordura total, sendo encontrado na maioria dos estudos redução de no máximo 10%, e explicaram o achado como consequência de potenciais erros metodológicos. Dentre estes, os autores citam a adesão dos glóbulos de gorduras às superfícies dos frascos durante o armazenamento, além dos métodos mais utilizados, gravimétricos, serem mais susceptíveis às variações (GAO, *et al.*, 2019). Os processos de congelamento e descongelamento podem acarretar rompimento das membranas dos glóbulos de gordura, propiciando sua coalescência e facilitando sua aderência às paredes dos frascos armazenadores (VIEIRA, *et al.*, 2004).

No Banco de Leite do estudo não existe um tempo de armazenamento na fase congelamento do leite cru, a pasteurização do leite ocorre conforme existe demanda e volume de LH, assim se optou por não avaliar a influência do congelamento na composição do leite humano.

A estocagem do leite humano pasteurizado deve ser armazenada em freezer destinado somente à estocagem de leite humano pasteurizado, a uma temperatura máxima de 10 °C, por até seis meses. Com o controle de temperatura rigoroso (ANVISA, 2006). Já a distribuição segue liberação de acordo com os critérios de prioridades e necessidades do receptor. Os critérios seguem a seguinte ordem: RN prematuro ou de baixo peso, que não suga; RN infectado, especialmente com enteroinfecções; RN em nutrição trófica; RN portador de imunodeficiência; RN portador de alergia a proteínas heterológicas; casos excepcionais e a critério médico (ANVISA, 2008).

Por fim, temos o porcionamento do LH conforme com a prescrição médica e/ou de nutricionista. O degelo deve ser realizado em banho-maria com temperatura aproximada de 40°C (BRASIL, 2006). Após porcionamento, o leite é distribuído para os hospitais onde estão internados os recém-nascidos que dele necessitam para sobreviver. O alimento poderá ser proporcionado pela equipe de enfermagem ou pela mãe e demais familiares. A forma de se administrar a dieta depende do estado clínico do lactente e pode ser ofertado via sonda, pelo método de gavagem simples ou contínua e via copinho e/ou translactação (BRASIL, 2011).

3.6 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

3.6.1 Definições e Aplicações

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformação de Fourier é uma técnica muito utilizada pela química e pela física para a definição de grupos funcionais da amostra, aplicada na identificação de moléculas orgânicas, através da avaliação de espectro. Podemos defini-la como o estudo da interação de uma onda eletromagnética com matéria, cujo principal objetivo é a determinação dos níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares, tendo a vantagem de providenciar uma mensuração rápida e simples, que requer o processamento mínimo da amostra antes da análise, assim não gerando resíduo (FACKLER & SCHWANNINGER, 2012; FORATO *et al.*, 2010). A técnica permite a identificação, qualificação e quantificação de compostos orgânicos nos alimentos, a partir de um único espectro (CAMPESTRINI, 2005).

A investigação de bandas espectrais de absorção na região do infravermelho pode revelar informações a respeito das vibrações moleculares, dessa forma, por meio da espectroscopia molecular pode-se analisar a geometria e as forças de interação entre os átomos que constituem a molécula. Alguns grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma região do espectro, independentemente da estrutura da molécula. Essas bandas permitem a obtenção de dados para fazer a identificação de estruturas. Esta determinação é muitas vezes realizada pela comparação do espectro obtido com bancos de dados existentes (SIVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; STUART, 1997).

Existem tipos de técnicas espectroscópicas, como por exemplo, a de radiofrequências (espectroscopia rotacional); infravermelho (espectroscopia vibracional) e região do visível à ultravioleta (espectroscopia eletrônica). Neste estudo, a região de interesse é aquele referente ao Infravermelho médio (IV), que possui várias aplicações que vão desde análise de moléculas pequenas até sistemas complexos com células e tecidos. De acordo com autores Hooler *et al.* (2009) o espectro IV é usualmente subdividido em três regiões: denominadas IV próximo, IV médio e IV distante, conforme os tipos de aplicações e instrumentação. A espectroscopia IV é devida a interação da radiação, acontece o acoplamento do campo elétrico oscilante da vibração molecular e o da radiação incidente. A faixa de radiação do infravermelho, no espectro eletromagnético, acontece na faixa entre o visível e micro-ondas (FORATO *et al.*, 2010). A Tabela 9 detalha os limites aproximados de cada região.

Tabela 9: Regiões espectrais do infravermelho.

Região	Comprimento de onda (λ) (nm)	Número de Onda (cm^{-1})
Próximo	780 a 2500	12800 a 4000
Médio	2500 a 50000	4000 a 200
Distante	50000 a 1000000	200 a 100

Fonte: Adaptado de HOOLER *et al.* (2009).

A região do infravermelho médio (Mid-Infrared - MIR) é a principal região de espectroscopia vibracional, apresentando informações sobre estrutura e conformação de moléculas orgânicas (como proteínas, polissacarídeos e lipídeos) (DUFOUR, 2009). A Tabela 10 mostra as regiões espectrais de interesse analítico na região do IV com as características dos materiais a que se aplicam.

Tabela 10: Regiões espectrais do infravermelho e suas principais aplicações.

Região	Número de Onda (cm ⁻¹)	Aplicações
Próximo	12800 a 4000	Materiais Sólidos ou Líquidos e misturas de gases
Médio	4000 a 200	Sólidos, Líquidos ou gases puros, misturas complexas.
Distante	200 a 10	Amostras Sólidas, líquidas e Gasosas.

Fonte: Adaptado de HOOLER *et al.* (2009)

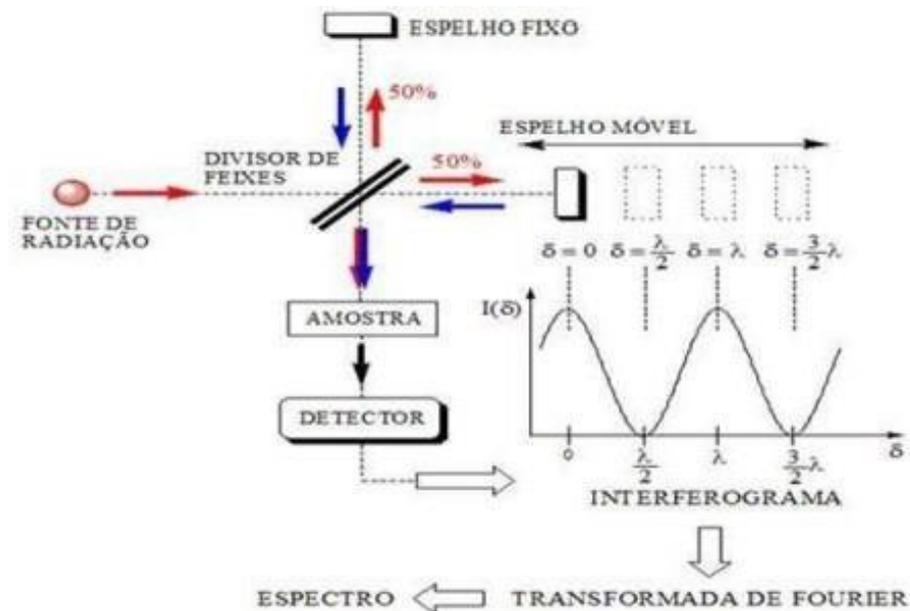
A técnica de espectroscopia pode ser utilizada análises quantitativas e qualitativas, gerando informações específicas sobre o produto investigado, uma vez que, os movimentos vibracionais das moléculas induzem a absorção na região infravermelha, formando bandas de absorção (DUFOUR, 2009).

3.6.2 A Espectroscopia na região do Infravermelho Médio por transformada de Fourier (FT-MIR)

Teve início no ano de 1802 com cientista Thomas Young, que observou através de experimento com luz, o fenômeno de interferência, reproduzido pela sobreposição de ondas em diversos pontos, gerando regiões onde se anularam e se amplificaram. Em 1892, o cientista Lord Rayleigh, utilizando uma operação matemática denominada transformada de Fourier, confirmou a relação do espectro, construído por Albert Abraham Michelson (RODRIGUES, 2012).

Nos espectrômetros FT - Figura 4, os elementos são obtidos pela divisão da fonte de radiação em dois feixes, deste modo os caminhos ópticos que podem ser variados periodicamente para fornecer padrões de interferência. As frequências de luz infravermelha que são absorvidas são aquelas que têm as mesmas frequências dos modos vibracionais. O espectro vibracional aparece como uma série de picos ou bandas as quais refletem o nível de energia vibracional da molécula (HOOLER *et al.*, 2009).

Figura 15: Esquema de Funcionamento do espectrômetro IV por Transformada de Fourier.



Fonte: Adaptado de RODRIGUES (2012).

Na Figura 15 é possível observar que no funcionamento do espectrômetro IV por transformada de Fourier a luz é emitida por uma fonte de luz comum, contudo, o feixe é dividido. Sendo que uma parte é refletida por um espelho fixo e de lá refletido de volta ao divisor de feixes, atravessando-o e atingindo a amostra e detector (setas vermelhas). A outra parte da intensidade luminosa inicial é refletida pelo espelho móvel (setas azuis). No momento em que os dois feixes recombinam no divisor de feixes (após serem refletidos nos espelhos fixo e móvel), haverá construções ou interferência destrutiva dependendo da diferença do caminho óptico, e medição da intensidade da luz em relação à posição do espelho móvel, chamado de interferograma. Em seguida, o programa no computador converte os dados medidos em um espectro, e então ocorrem duas transformações: uma pelo interferômetro, uma pelo computador (BARTH, 2007).

A intensidade destes picos ou bandas no espectro pode ser verificado no eixo vertical e a posição das bandas, no eixo horizontal. Esta posição se apresenta em número de ondas, e tem a unidade em centímetro inverso (cm^{-1}). A intensidade das bandas ainda pode ser apresentada como transmitância (T) ou absorvância (A). A transmitância é a razão entre a intensidade da radiação transmitida (I) por uma amostra e a intensidade da radiação incidente (I_0) e a absorvância é o logaritmo decimal do inverso da transmitância. Essa intensidade de absorção

está diretamente relacionada a sua concentração, o que permite uma análise quantitativa do composto (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005). Dessa maneira, quanto maior for a intensidade de uma banda, maior será a concentração de determinado composto em um produto, e vice-versa. Para realização desse estudo optou-se pela apresentação em absorbância.

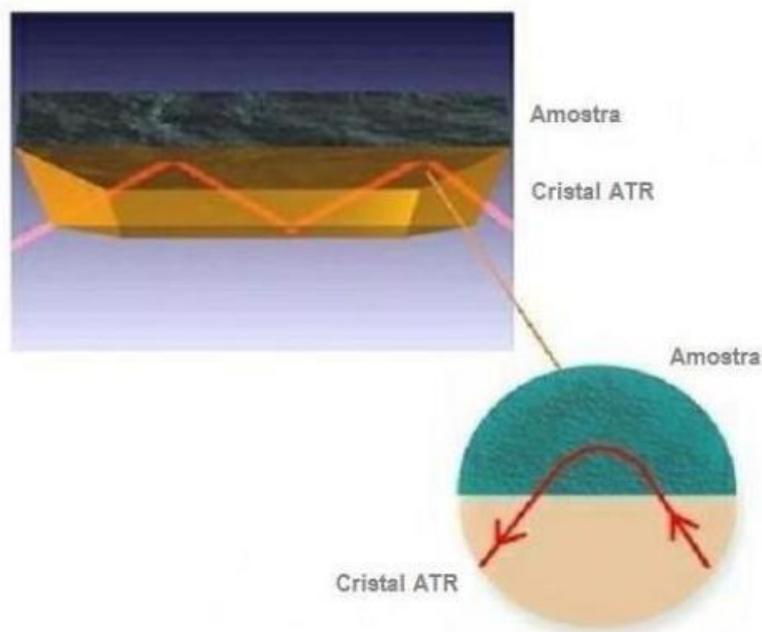
A utilização desse equipamento traz vantagens, como por exemplo, os elementos atingirem o detector simultaneamente, tornando possível a obtenção de espectros em poucos segundos. E também pelos espectros gerados terem maior poder de resolução e reprodutibilidade, permitindo análise de dados complexos (HOOLER et al., 2009).

Nas biomoléculas, a maior absorção espectral está situada nas bandas referentes às ligações N-H, C=O, C-O, C-H e P=O, presentes em lipídios, proteínas, açúcares e ácidos nucleicos. Deste modo, sistemas biológicos tais como proteínas, lipídios, biomembranas, carboidratos e tecidos têm sido caracterizados com sucesso utilizando a espectroscopia no Infravermelho (STUART, 1997).

3.6.3 Reflectância Total Atenuada (ATR)

Com intuito de melhorar o processo de análise de amostras e com os inúmeros aperfeiçoamentos dos equipamentos espectroscópios, houve a necessidade do desenvolvimento de um acessório utilizando a Reflectância Total Atenuada (ATR). Com esta técnica, a amostra é posicionada sobre um cristal opticamente denso com alto índice de refração, como por exemplo, o diamante. Como ilustra a Figura 17, a radiação infravermelha é produzida e direcionada, a um ângulo específico pelo equipamento, a qual passa através do cristal de diamante em direção à amostra. Parte do feixe de luz penetra uma camada fina da superfície da amostra (0,5 μm - 5,0 μm) (onda evanescente), podendo ser absorvido, enquanto outra parte do feixe de luz é refletida e, em consequência, a radiação que atinge o detector traz informações sobre a radiação IR absorvida pela amostra testada (BARTH, 2007).

Figura 16: Funcionamento do ATR



Fonte: Adaptado de BRUKER OPTICS (2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Considerando que o processamento de qualquer alimento provoca perdas nutricionais e que no caso do leite humano pasteurizado essas perdas podem ocorrer alterações no valor nutricional, viu-se a necessidade desse projeto de pesquisa, que tem como propósito investigar a composição do leite humano oferecido pelo BLH de Juiz de Fora, assim contribuindo com a população da cidade e região, mais precisamente com as mães e crianças que dependem da utilização do leite humano coletado e ofertado pelo banco de leite do município.

Com o monitoramento da pasteurização do leite humano, espera-se a identificação de influências positivas e/ou negativas na qualidade do leite humano. Sabe-se que esse procedimento é importante para a manutenção da qualidade microbiológica do leite, no entanto, alguns estudos têm apontado que no processo, há uma possível redução no teor de lipídios e proteínas, redução de vitaminas hidrossolúveis, redução das propriedades imunológicas e a inativação de enzimas.

Deste modo, torna-se indispensável especular com maior profundidade o efeito desse processo sobre tais constituintes com objetivo de quantificar e interpretar as possíveis alterações decorrentes de sua manipulação. Assim, o presente estudo envolveu a análise da composição nutricional de amostras de leite já estocadas no Banco de Leite humano de Juiz de Fora, desta

maneira não existiu nenhum contato com as doadoras, no entanto, dados relativos ao período de gestação e à lactação foram coletados das fichas de informação das mesmas. Devido a isso, o projeto não precisou ser submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. Assim, a quantidade de amostra foi de acordo com o estoque de doação de leite do local, por consequência foram vários estágios de lactação (leite colostro, leite de transição e leite maduro). O estudo foi realizado com total de 129 amostras de leite cru e 129 amostras de leite processado/pasteurizado, onde 6 amostras as mulheres estavam na fase colostro, 16 amostras encontravam na transição e 107 amostras no estágio final maduro.

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE LEITE HUMANO

Para executar a doação do leite humano, as doadoras de Juiz de Fora e região receberam “kits” contendo touca, luvas, máscara e vidros estéreis, para que realizassem a coleta de forma higiênica e foram orientadas a armazenarem o leite no congelador doméstico até posterior envio ao Banco de leite. Já na unidade fizeram os registros com informações das doadoras e as amostras estiveram congeladas até o momento da pasteurização. Todo o processamento do leite humano foi efetuado no BLH do estudo, que passou pelo processo de descongelamento, o qual foi cometido ao banho-maria a uma temperatura entre 40°C a 45°C, após este procedimento o material passou pela seleção e classificação e reenvasado de forma asséptica.

Na pasteurização, os frascos ficaram em banho-maria até atingir a temperatura de 62,5°C durante 30 minutos. Após essa técnica, o leite foi resfriado rapidamente em banho de gelo a uma temperatura inferior a 5°C. Para a análise, foram coletadas 2 mL de cada amostra antes e após a pasteurização em tubos Falcon estéreis, os quais foram transportados em caixas isotérmicas contendo gelo seco reciclável, com a temperatura entre 1,5°C a 5°C. As análises foram realizadas no mesmo dia, no Laboratório de Espectroscopia no Infravermelho da Universidade Federal de Juiz de Fora. No momento do reenvase se coletou as amostras de leite cru e após o processo de pasteurização, as amostras de leite pasteurizado.

A pesquisa foi realizada no equipamento espectrômetro MIR (VERTEX 70) da marca Bruker®, com acessório ATR e Software OPUS® 6.5. As medidas foram realizadas em absorvância com resolução de 4 cm⁻¹ e varredura de 64 leituras no intervalo de 400 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹. Para análise dos dados se utilizou os softwares método Análise de Componentes Principais (PCA) e OriginPro 8.5. As medidas foram realizadas em triplicata. Em espectros de absorção, através de uma gota de leite: fazendo um feixe de luz na região do infravermelho

incidir sobre a substância e determinando as frequências absorvidas por ela (LEITE & PRADO, 2012).

A amostra foi inserida sobre o cristal do ATR previamente limpo com álcool isopropílico. O equipamento promove a leitura de acordo com os parâmetros selecionados, e, ao final, oferece como resultado um espectro da média das 64 leituras, correspondente às vibrações dos componentes químicos da amostra. Estes espectros foram avaliados e comparados visualmente e a partir dos dados foram realizados cálculos das médias para posterior análise. O espectro do LH foi convertido em arquivos de texto utilizando o software OPUS 6.5. As absorbâncias da região MIR, foram submetidas a cálculos de análise de componentes principais (PCA) e também ao método dos mínimos quadrados parciais (PLS), para avaliações quantitativas.

4.2 HISTÓRICO DAS DOADORAS

A seguir o histórico das amostras utilizadas para comparação espectral entre leite cru e processado/pasteurizado, onde a identificação ocorreu através de numeração e letra, conforme especificação: A codificação seguiu onúmero de acordo com lote do Banco de Leite do estudo, e as letras **C** para leite cru e **P** designado leite processado/pasteurizado.

Tabela 11: Descrição das doadoras.

Data da coleta da Amostra no BLH-JF	Identificação da Amostra	Dias de Lactação	Estágio de Lactação	Acidez Dornic	Kcal	Idade Gestacional
27/06/2022	184 C – 1176 P	42 dias	Maduro	6	619	38S 4D
27/06/2022	185 C - 1183 P	44 dias	Maduro	7	559	38S 4D
27/06/2022	202 C – 1178 P	09 dias	Transição	6	608	38S
27/06/2022	219 C – 1159 P	157 dias	Maduro	4	613	37S
27/06/2022	234 C - 1179 P	52 dias	Maduro	6	519	39S
27/06/2022	236 C – 1167 P	83 dias	Maduro	5	611	40S 5D
27/06/2022	238 C – 1169 P	54 dias	Maduro	6	519	39S 1D
27/06/2022	242 C – 1157 P	37 dias	Maduro	5	511	38S 4D
27/06/2022	243 C – 1171 P	39 dias	Maduro	5	660	38S 4D
27/06/2022	254 C – 1173 P	49 dias	Maduro	5	739	39S
27/06/2022	255 C – 1184 P	51 dias	Maduro	7	619	39S
27/06/2022	256 C – 1154 P	07 dias	Colostro	4	714	30S
27/06/2022	257 C – 1156 P	10 dias	Transição	4	511	30S
27/06/2022	261 C – 1162 P	65 dias	Maduro	4	397	40S
27/06/2022	272 C – 1174 P	33 dias	Maduro	5	569	37S 3D
27/06/2022	264 C – 1180 P	645 dias	Maduro	6	400	41S 1D
28/06/2022	229 C - 1189 P	08 dias	Transição	5	664	39S
28/06/2022	232 C – 1205 P	49 dias	Maduro	6	616	38S 4D

28/06/2022	235 C – 1201 P	62 dias	Maduro	5	619	39S
28/06/2022	246 C – 1186 P	06 dias	Colostro	5	664	38S 4D
28/06/2022	247 C - 1187 P	07 dias	Colostro	6	883	38S 4D
28/06/2022	248 C – 1196 P	08 dias	Transição	6	829	38S 4D
28/06/2022	249 C – 1190 P	09 dias	Transição	5	718	38S 4D
28/06/2022	250 C – 1191 P	10 dias	Transição	5	569	38S 4D
28/06/2022	251 C - 1192 P	11 dias	Transição	5	611	38S 4D
28/06/2022	258 C – 1188 P	12 dias	Transição	4	624	30S
28/06/2022	273 C – 1194 P	10 dias	Transição	5	611	39S
28/06/2022	274 C – 1195 P	11 dias	Transição	5	608	39S
28/06/2022	286 C – 1199 P	314 dias	Maduro	5	564	38S 6D
05/07/2022	307 C – 1244 P	194 dias	Maduro	5	511	40S 5D
05/07/2022	308 C – 1237 P	197 dias	Maduro	4	504	40S 5D
05/07/2022	309 C – 1238 P	199 dias	Maduro	4	502	40S 5D
05/07/2022	312 C – 1239 P	61 dias	Maduro	4	452	39S 1D
05/07/2022	313 C – 1242 P	50 dias	Maduro	4	624	38S 4D
05/07/2022	316 C – 1246 P	25 dias	Maduro	5	735	32S
05/07/2022	317 C – 1258 P	27 dias	Maduro	6	755	32S
05/07/2022	318 C – 1263 P	36 dias	Maduro	8	519	40S 5D
05/07/2022	319 C – 1261 P	37 dias	Maduro	6	*	40S 5D
05/07/2022	320 C - 1243 P	38 dias	Maduro	4	563	40S 5D
05/07/2022	321 C – 1247 P	54 dias	Maduro	5	624	38S 4D
05/07/2022	329 C – 1251 P	41 dias	Maduro	5	517	37S 3D
05/07/2022	334 C - 1253 P	40 dias	Maduro	5	401	37S
05/07/2022	336 C – 1255 P	169 dias	Maduro	5	509	37S
05/07/2022	339 C – 1260 P	646 dias	Maduro	6	608	41S 1D
05/07/2022	342 C – 1236 P	14 dias	Transição	5	624	39S
06/07/2022	323 C - 1271 P	58 dias	Maduro	5	611	38S 4D
06/07/2022	340 C – 1272 P	657 dias	Maduro	5	704	41S 1D
06/07/2022	344 C – 1285 P	17 dias	Maduro	6	718	39S
06/07/2022	345 C – 1275 P	18 dias	Maduro	5	608	39S
06/07/2022	351 C – 1286 P	27 dias	Maduro	6	606	41S
06/07/2022	352 C – 1266 P	172 dias	Maduro	4	496	40S 4D
06/07/2022	362 C - 1283 P	109 dias	Maduro	5	613	40S 5D
06/07/2022	363 C – 1284 P	110 dias	Maduro	5	711	40S 5D
06/07/2022	364 C - 1289 P	12 dias	Transição	6	714	38S 4D
06/07/2022	372 C – 1288 P	45 dias	Maduro	6	606	*
12/07/2022	378 C – 1295 P	56 dias	Maduro	5	505	38S 4D
12/07/2022	375 C – 1302 P	66 dias	Maduro	6	616	39S 1D
12/07/2022	380 C – 1304 P	63 dias	Maduro	6	621	38S 4D
12/07/2022	388 C – 1294 P	108 dias	Maduro	4	511	40S 5D
12/07/2022	404 C – 1291 P	12 dias	Transição	7	501	39S
12/07/2022	401 C – 1297 P	83 dias	Maduro	5	611	39S
12/07/2022	399 C – 1308 P	146 dias	Maduro	6	500	36S 6D
12/07/2022	389 C – 1307 P	105 dias	Maduro	6	499	40S 5D
12/07/2022	412 C – 1312 P	662 dias	Maduro	6	616	41S 1D
12/07/2022	411 C – 1293 P	45 dias	Maduro	7	820	37S 3D
12/07/2022	409 C – 1298 P	69 dias	Maduro	5	598	41S
12/07/2022	406 C – 1310 P	36 dias	Maduro	6	608	38S
12/07/2022	417 C – 1301 P	19 dias	Maduro	5	606	39S
19/07/2022	403 C – 1365 P	222 dias	Maduro	5	616	39S 6D
19/07/2022	480 C - 1372 P	51 dias	Maduro	8	606	40S
19/07/2022	473 C – 1351 P	06 dias	Colostro	5	718	36S
19/07/2022	474 C – 1352 P	07 dias	Colostro	5	632	36S
19/07/2022	478 C – 1370 P	50 dias	Maduro	7	611	40S

19/07/2022	479 C – 1367 P	51 dias	Maduro	6	606	40S
19/07/2022	454 C – 1361 P	75 dias	Maduro	5	511	39S 1D
19/07/2022	457 C – 1366 P	88 dias	Maduro	6	616	39S
19/07/2022	463 C – 1362 P	150 dias	Maduro	5	601	36S 6D
19/07/2022	465 C – 1363 P	26 dias	Maduro	5	606	39S
19/07/2022	441 C – 1357 P	29 dias	Maduro	5	721	34S 5D
19/07/2022	443 C – 1349 P	03 dias	Colostro	4	616	30S
19/07/2022	444 C – 1358 P	111 dias	Maduro	4	711	40S 5D
19/07/2022	450 C – 1360 P	64 dias	Maduro	5	718	38S 4D
20/07/2022	501 C – 1390 P	95 dias	Maduro	5	825	39S 4D
20/07/2022	481 C - 1397 P	52 dias	Maduro	7	622	40S
20/07/2022	494 C – 1388 P	104 dias	Maduro	5	448	39S 4D
20/07/2022	482 C – 1386 P	54 dias	Maduro	5	482	40S
20/07/2022	496 C – 1395 P	88 dias	Maduro	6	504	40S 5D
20/07/2022	477 C – 1396 P	43 dias	Maduro	7	613	38S
20/07/2022	475 C – 1385 P	20 dias	Maduro	5	718	39S
20/07/2022	468 C – 1394 P	44 dias	Maduro	6	611	38S
20/07/2022	467 C – 1382 P	56 dias	Maduro	5	507	37S 3D
20/07/2022	466 C – 1380 P	55 dias	Maduro	5	608	37S 3D
20/07/2022	464 C – 1393 P	154 dias	Maduro	6	511	36S 6D
20/07/2022	456 C – 1378 P	71 dias	Maduro	5	613	38S 4D
20/07/2022	458 C – 1379 P	91 dias	Maduro	5	500	39S
25/07/2022	499 C – 1409 P	93 dias	Maduro	4	613	40S 5D
25/07/2022	504 C – 1426 P	122 dias	Maduro	7	630	40S 5D
25/07/2022	507 C – 1411 P	127 dias	Maduro	5	771	39S 1D
25/07/2022	509 C – 1414 P	85 dias	Maduro	5	613	39S
25/07/2022	516 C – 1416 P	81 dias	Maduro	5	398	39S 1D
25/07/2022	519 C – 1410 P	140 dias	Maduro	4	398	38S 2D
25/07/2022	520 C - 1412 P	91 dias	Maduro	4	399	40S
25/07/2022	529 C – 1427 P	33 dias	Maduro	7	565	39S
25/07/2022	537 C – 1419 P	669 dias	Maduro	5	1038	41S 1D
25/07/2022	538 C – 1422 P	671 dias	Maduro	5	964	41S 1D
25/07/2022	539 C – 1424 P	673 dias	Maduro	6	970	41S 1D
25/07/2022	545 C – 1406 P	14 dias	Transição	6	667	36S
25/07/2022	546 C – 1403 P	14 dias	Transição	5	661	36S
25/07/2022	547 C – 1405 P	14 dias	Transição	5	718	36S
26/07/2022	505 C – 1444 P	121 dias	Maduro	5	507	40S 5D
26/07/2022	506 C – 1431 P	121 dias	Maduro	4	608	40S 5D
26/07/2022	510 C – 1432 P	87 dias	Maduro	4	613	39S
26/07/2022	513 C – 1435 P	80 dias	Maduro	4	451	38S 4D
26/07/2022	527 C – 1446 P	62 dias	Maduro	5	613	37S 3D
26/07/2022	534 C – 1455 P	49 dias	Maduro	6	613	38S
26/07/2022	535 C – 1448 P	52 dias	Maduro	5	613	38S
26/07/2022	540 C – 1437 P	675 dias	Maduro	5	718	41S 1D
26/07/2022	541 C – 1450 P	677 dias	Maduro	5	958	41S 1D
26/07/2022	542 C – 1452 P	679 dias	Maduro	5	816	41S 1D
26/07/2022	550 C – 1440 P	17 dias	Maduro	4	721	36S
26/07/2022	556 C - 1453 P	16 dias	Maduro	5	721	36S
26/07/2022	562 C – 1442 P	340 dias	Maduro	4	621	38S 6D
27/07/2022	536 C – 1476 P	54 dias	Maduro	6	*	38S
27/07/2022	551 C - 1459 P	17 dias	Maduro	4	655	36S
27/07/2022	552 C – 1464 P	17 dias	Maduro	4	634	36S
27/07/2022	553 C – 1467 P	18 dias	Maduro	4	616	36S
27/07/2022	555 C – 1468 P	19 dias	Maduro	4	711	36S
27/07/2022	559 C - 1479 P	24 dias	Maduro	7	*	39S 6D

Fonte: Elaboração própria com os dados fornecidos pelo BLH de Juiz de Fora, MG.

*Dados não obtidos.

Para realizar a análise estatística multivariada utilizou-se do método de análise por componentes principais (PCA), cujo propósito é a obtenção de um pequeno número de combinações lineares (componentes principais – PC's) de um conjunto de variáveis, que retenham maiores informações contidas nas variáveis originais e a análise por agrupamento hierárquico, em que se busca obter a melhor forma de agrupar um conjunto de objetos compostos por variáveis conforme o grau de semelhança. Dessa maneira, conseguimos extrair o máximo de informações de uma tabela com muitas variáveis, convertendo-a em gráficos informatizados, a partir da combinação linear das variáveis originais. Assim, pode-se dizer que o PCA tenta agrupar aquelas variáveis que estão altamente correlacionados (SIMAS, 2005).

De acordo com autores Santos et al. (2012) ao aplicar a técnica PCA a um conjunto de variáveis, tendo como exemplo, espectros no infravermelho, o conjunto original é substituído por um novo conjunto de variáveis denominado de Componentes Principais (CPs). A contribuição de cada componente principal é apresentada em porcentagem e sua relevância é analisada segundo essa contribuição, melhor dizendo, a parcela de variância total explicada pelo componente. O método vem sendo utilizado aliada à espectroscopia MIR, uma vez que fornecem espectros complexos, com grande número de variáveis, com a PCA facilita a visualização dos dados em duas ou três dimensões, de modo que só as informações relevantes sejam consideradas (ALMEIDA, 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

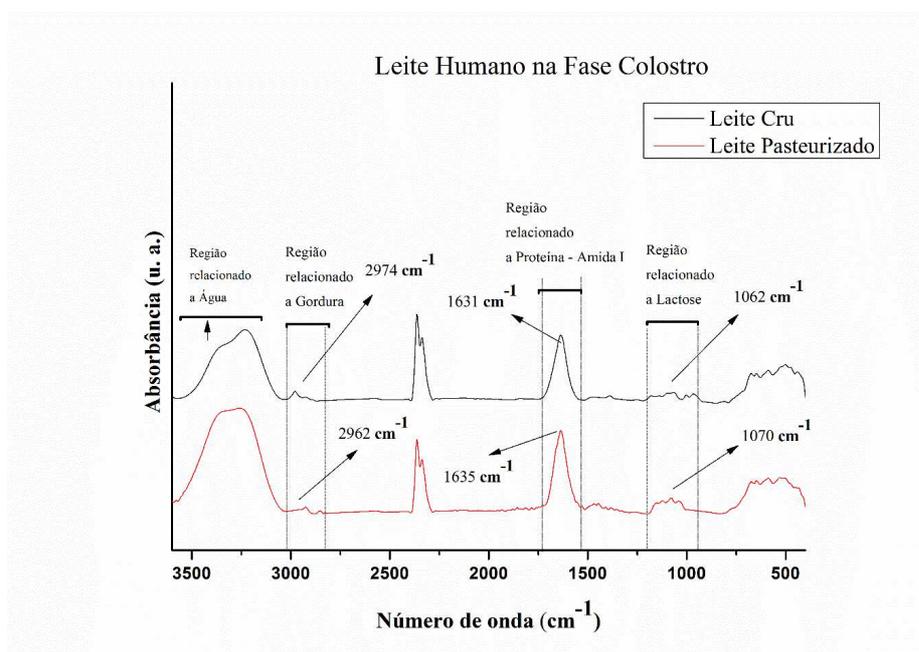
5.1 ANÁLISES DE ESPECTROS DE INFRAVERMELHO

Nesta subseção são apresentados os resultados das análises espectroscópicas por FT–MIR, onde foram identificadas as bandas de proteínas, lipídios e lactose nos espectros infravermelhos. Para essa análise usamos apenas três das amostras de leites, nos estágios de lactação colostro 256 C - 1154 P, transição 202 C – 1178 P e maduro 219 C e 1159 P. Estas amostras foram utilizadas para analisar a alteração produzida pelo processamento/pasteurização e depois, para comparar as variações de composições no leite

cru e pasteurizado entre doadoras. Os espectros (Figura 17) mostram as regiões de lipídio, proteínas e lactose, juntamente com água, uma vez que essas biomoléculas são os componentes mais abundantes do LH.

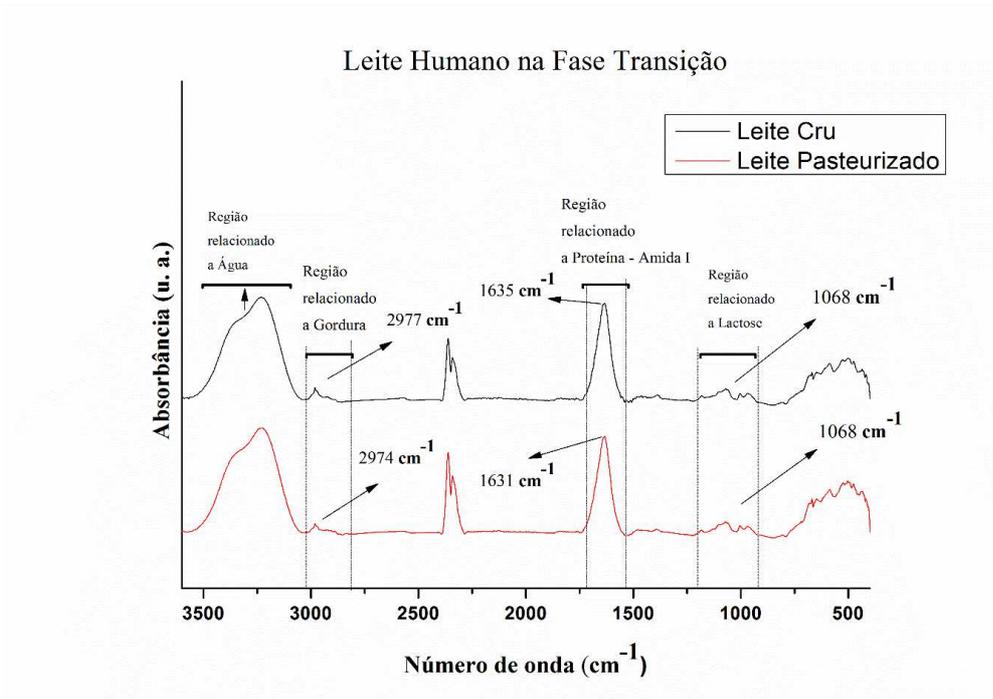
Foram calculadas as áreas nos intervalos de: 2995 e 2830 cm^{-1} referente a região de lipídios, 1700 e 1590 cm^{-1} região de amida I de proteínas e 1190 e 955 cm^{-1} região de lactose. Sendo que a região de 2995 a 2830 cm^{-1} se relaciona aos modos de vibração dos grupos CH_2 e CH_3 de ácidos graxos; a de 1700 a 1590 cm^{-1} , a amida I da proteína que representa 80 % da vibração do estiramento $\text{C}=\text{O}$ e a de 1190 a 955 cm^{-1} , as vibrações das ligações $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ de polissacarídeos (MANTSCH; CHAPMAN, 1996). Por verificação visual, nos espectros de LH cru e após o processo de pasteurização foi possível observar as diferenças nos contornos de bandas e/ou intensidades relativas entre os picos, em alguns momentos foi maior a concentração de um determinado composto, indicando variações na composição do leite humano.

Figura 17: Espectro FT-MIR de leite humano de doadora no estágio de lactação colostro 256 C - 1154 P, para averiguação da alteração produzida pelo processamento/pasteurização.



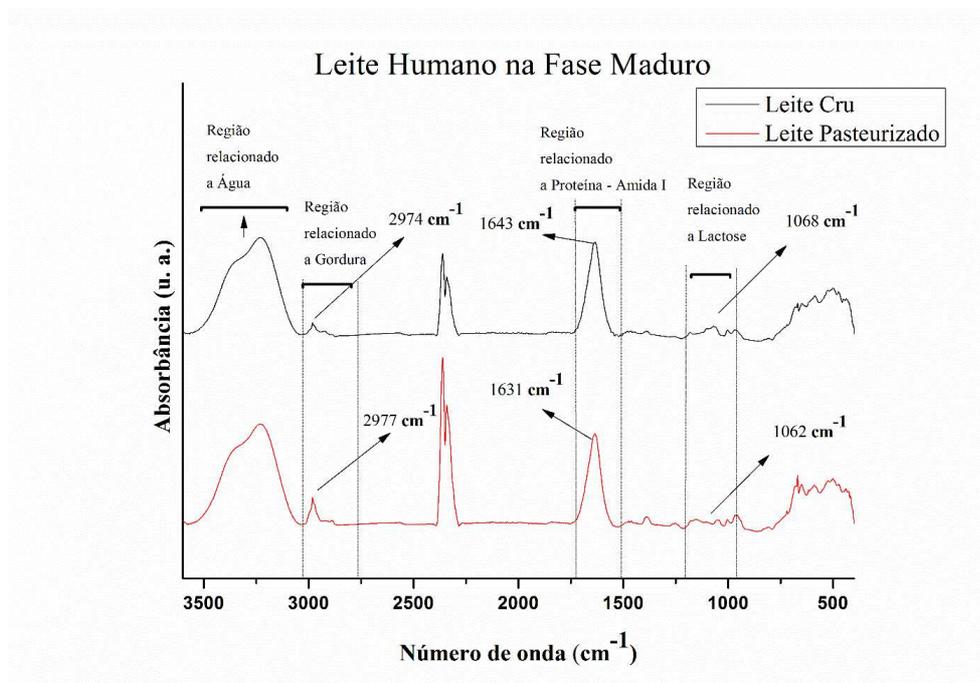
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 18: Espectro FT-MIR de leite humano de doadora no estágio de lactação transição 202 C - 1178 P, para averiguação da alteração produzida pelo processamento/pasteurização.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 19: Espectro FT-MIR de leite humano de doadora no estágio de lactação maduro 219 C e 1159 P, para averiguação da alteração produzida pelo processamento/pasteurização.



Fonte: Dados da pesquisa.

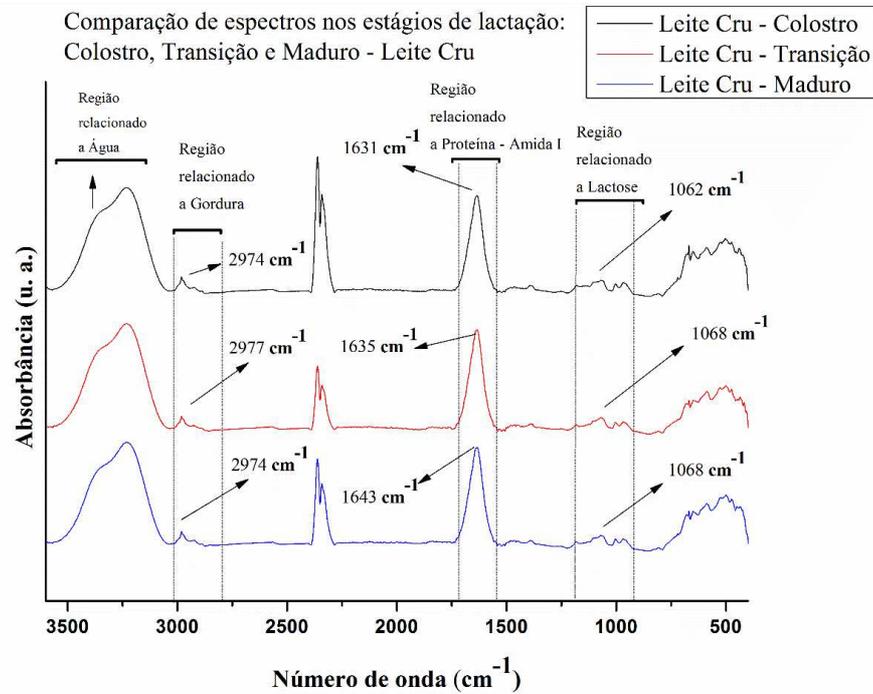
O aumento dos componentes de lipídios, proteínas e lactose depois da pasteurização pode levar a equívocos quanto ao aporte nutricional. Resultados parecidos foram encontrados

pela autora Heche (2013) utilizando espectroscopia no infravermelho médio, onde constatou que após o processamento/pasteurização o leite torna-se mais homogêneo e perde suas características individuais. Já o autor Borgo (2010) disse que essas alterações podem ser causadas por vários fatores, como falta de homogeneização no processamento e coalescência dos glóbulos de gordura, adesão de moléculas de gordura nas paredes internas dos recipientes utilizados no processo.

Sabe-se que a pasteurização é um dos principais métodos utilizados para extensão da vida útil de um alimento tendo como base os tratamentos térmicos convencionais, que fornecem a segurança e conservação necessárias, embora possa levar à perda de propriedades sensoriais e nutricionais. Em estudo realizado pelos autores Favaretto *et al.* (2016) foi demonstrado que o processo de pasteurização influenciou negativamente nas características físico-químicas do mesmo, diminuindo o teor de lipídeos e proteínas, intervindo em seu valor nutritivo e diminuindo a qualidade do produto. Os autores explicam que essa diminuição do teor de proteínas pode estar associada ao calor empregado na técnica de pasteurização, quando submetidas ao aquecimento às proteínas se desnaturam.

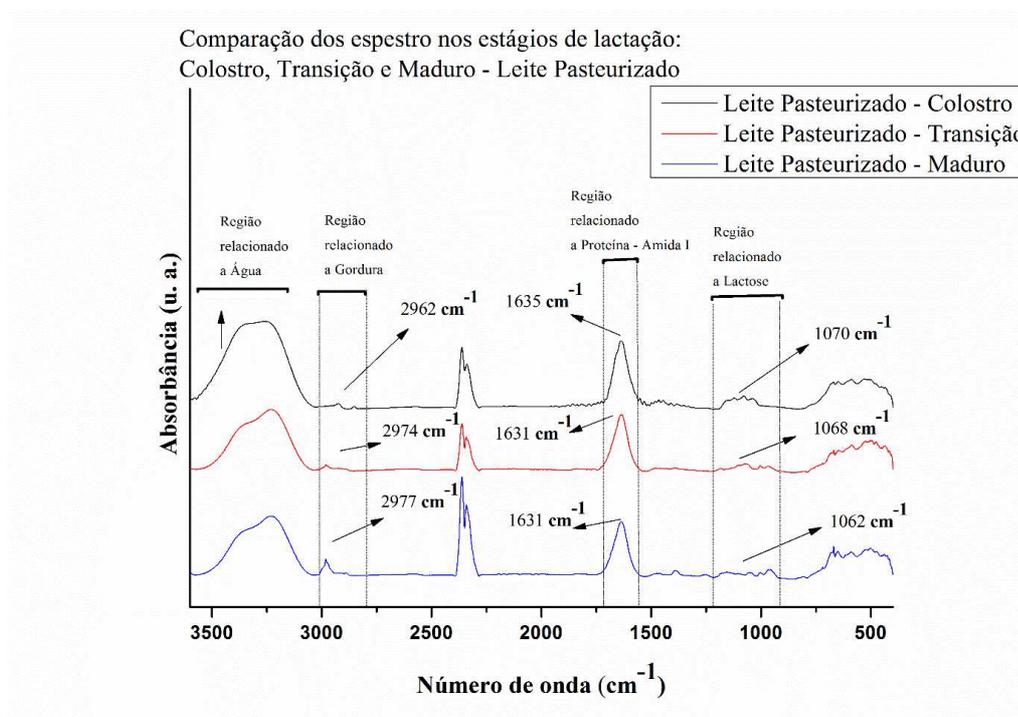
Para comparar as variações de composições no leite cru e pasteurizado entre doadoras nos estágios de lactação, utilizou-se as mesmas amostras anteriores, fase colostro 256 C - 1154 P, transição 202 C – 1178 P e maduro 219 C e 1159 P.

Figura 20: Espectro FT-MIR de leite humano de doadoras de leite cru, nos estágios de lactação colostro 256 C - 1154 P, transição 202 C – 1178 P e maduro 219 C e 1159 P, para comparação as variações de composições no leite cru e pasteurizado entre doadoras nos estágios de lactação.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 21: Espectro FT-MIR de leite humano de doadoras após o processo de pasteurização, nos estágios de lactação colostro 256 C - 1154 P, transição 202 C – 1178 P e maduro 219 C e 1159 P, para comparação as variações de composições no leite cru e pasteurizado entre doadoras nos estágios de lactação.



Fonte: Dados da pesquisa

Com esses espectros foi possível observar que existem variações na composição do leite do humano, em relação aos estágios de lactação colostro, transição e maduro, contudo esse dado ficou mais evidente após a pasteurização, precisando levar em consideração que analisamos os dados de apenas três amostras das 129 amostras coletadas na análise dos espectros. Os resultados apresentados demonstraram coerência com o exposto na literatura, trazendo fundamento para realização de mais estudos, sendo que a espectroscopia no infravermelho se mostrou bastante útil para analisar as amostras de leite humano bem como caracterizar seus principais componentes, lipídios, proteínas e lactose.

5.2 ANÁLISES DE COMPONENTES PRINCIPAIS

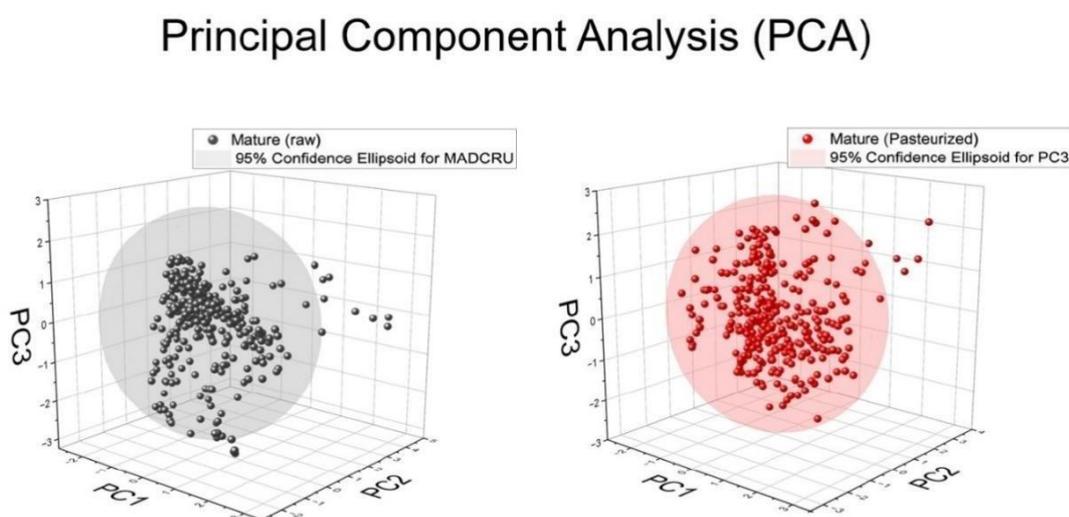
Nesta subseção são apresentados todos os gráficos dos *scores* das análises dos componentes principais referentes às amostras de leite cru e do pasteurizado nas três fases (colostro, transição e maduro).

5.2.1 Análise de componentes principais em amostras de leite: colostro, transição e maduro.

Ao fazer o PCA definimos um padrão, no qual os pontos dentro da esfera se encontram dentro da média, que são definidas pelo próprio conjunto de dados que foi medido, os pontos que saíram da média, é um leite que por alguma razão está com uma característica diferente das outras amostras, pode-se observar que alguns apresentaram diferentes, uma justificativa para isso seria a variabilidade da composição do leite entre os indivíduos, isso pode ter sido influenciado pelos fatores intrínsecos e extrínsecos à amamentação. Como exemplo desses fatores intrínsecos, cita-se, momento de coleta (antes e depois de mamada), idade gestacional, idade e paridade materna, dieta materna, diferenças individuais, adequação do peso de nascimento à idade gestacional (CALIL *et al.* 2011). E com relação aos fatores extrínsecos, a maneira como ocorreu a manipulação dos tais leites no BLH até o momento da coleta das amostras.

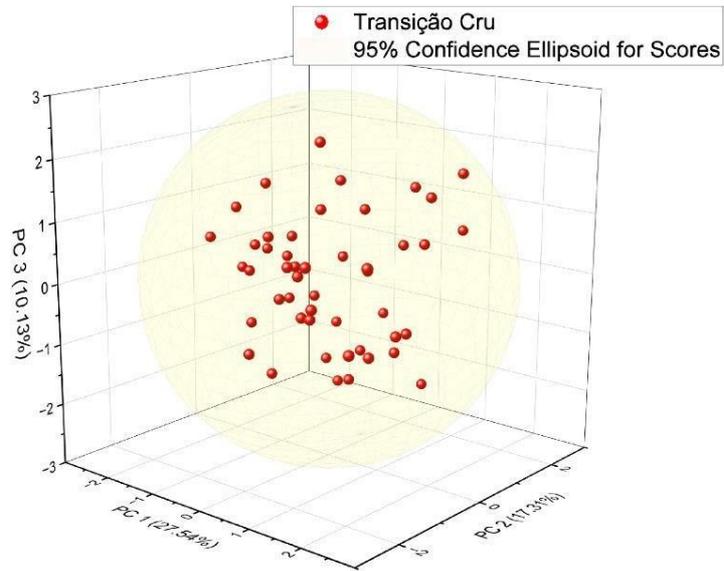
Já em relação a diferença do leite cru e pasteurizado maduro, a princípio não conseguimos constatar que a pasteurização estaria afetando na composição dos leites, o que pode ser justificado pela forma como foi efetuado as análises e devido a quantidade de amostras que foi realizado o estudo, visto que o leite humano é um alimento difícil de ser obtido pelos Bancos de Leite.

Figura 22: Análise de componente principal. Leite maduro cru e pasteurizado.



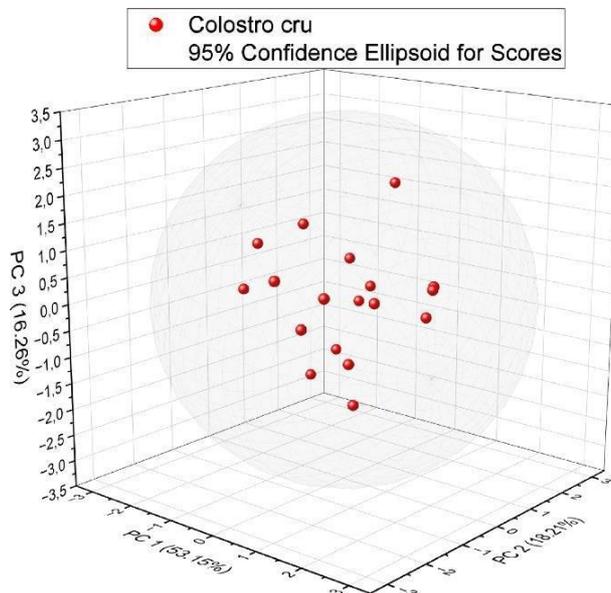
Fonte: Elaboração Própria.

Figura 23: Análise de componente principal. Leite transição.



Fonte: Elaboração Própria.

Figura 24 Análise de componente principal. Leite colostro.

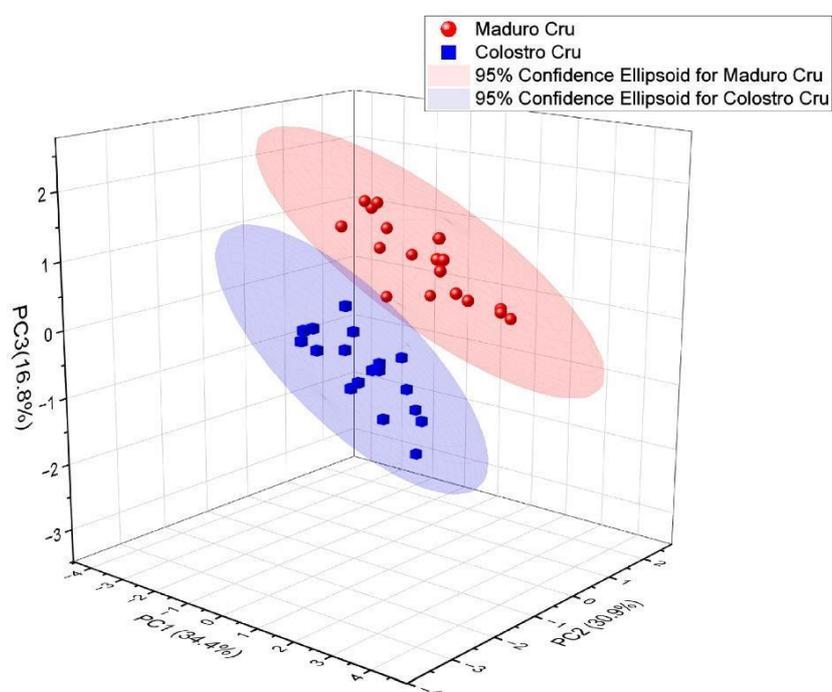


Fonte: Elaboração Própria.

5.2.2 Análise de componentes principais para diferenciar as fases do leite.

Nesta subseção conseguimos diferenciar através da técnica de espectroscopia os dois tipos de leite: colostro e maduro. De acordo com os autores Calil *et al.* (2011) o leite humano sofre modificação em sua composição nas fases de lactação, onde o colostro possui uma maior concentração de proteínas, minerais, vitaminas, uma menor porção de lactose, gorduras e vitaminas do complexo B. Na fase de transição, a sua composição existe uma diminuição do volume de proteínas, contudo é rico em gordura e lactose. E o leite maduro, contém todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento físico e cognitivo para o recém-nascido. Sua composição é um equilíbrio perfeito entre macronutrientes (proteína, carboidrato e lipídeos) e micronutrientes (vitaminas e minerais).

Figura 25: Análise de componente principal. Leite colostro e maduro.



Fonte: Elaboração Própria.

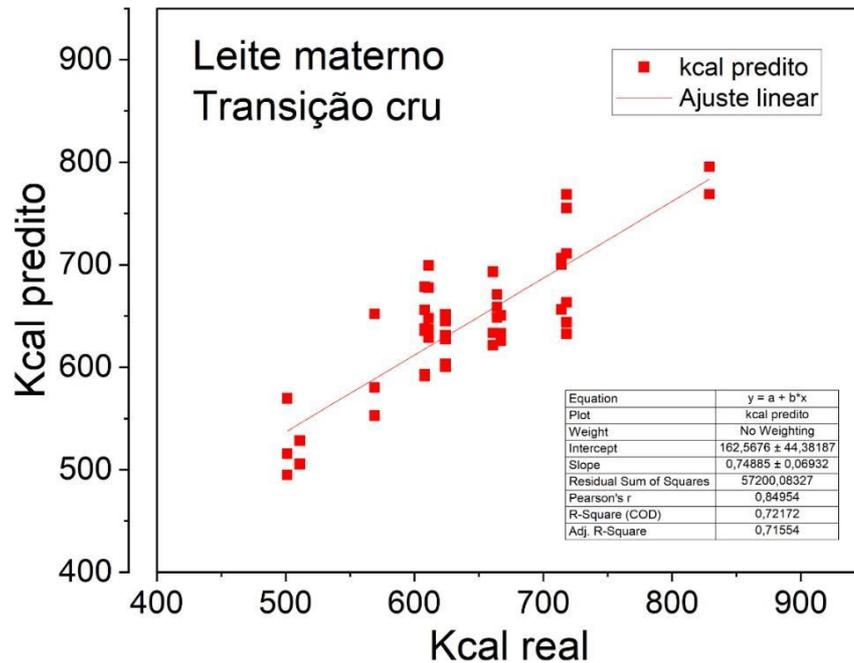
5.2.3 Análise para quantificar as propriedades do leite.

Por meio do método dos mínimos quadrados parciais foi possível encontrar o melhor ajuste para um conjunto de dados fornecidos pelo Banco de Leite, uma vez que cada espectro desse corresponde a tais medidas que foram feitas no local do estudo. Comparados aos resultados das análises do equipamento de espectroscopia, tentando minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre o valor estimado e os dados observados, permitindo assim

curvas de ajustes de kcal e Acidez. O método consiste no estabelecimento de uma matriz de correlação, na qual são extraídas as informações essenciais dos espectros, e relacionadas às grandezas medidas (neste caso, acidez e valor nutricional). Os resíduos são descartados e o modelo construído utiliza um número pequeno de fatores que carregam pelo menos 90% da variância dos dados. Normalmente, o número de fatores varia entre 2 e 10.

Até o momento esse é um resultado preliminar, mostrando que existe potencial para realizar as análises, o que seria muito interessante para os bancos de leite que não haveria a necessidade de realizar análises de determinação de acidez e kcal, poupando gastos com reagentes e tempo com os processos. Este método permite estabelecer correlações entre as quantificações de acidez e valor nutricional obtidas no Banco de Leite com os espectros obtidos para as amostras. Naturalmente, os modelos são melhores (com melhor capacidade de predição), quando há significativa variação dos valores das propriedades a serem correlacionadas. Por isso, sugerimos a realização de mais medidas para aprimorar os modelos. A figura 27 mostra o resultado do modelo para o valor nutricional, comparando as previsões e os valores efetivamente medidos no Banco de Leite. Observa-se uma dispersão e também a dependência linear entre ambos. Um ajuste perfeito forneceria o valor de $R^2=1$, contudo, a faixa de 0.7 a 1 é considerada boa. O *slope* da curva de ajuste foi de 0.75, enquanto que o *intercept* foi de 163 indicando que seria necessário efetuar pré-processamento mais apurado dos espectros. Os valores ideais seriam, respectivamente, 1 e 0. Há várias formas de otimizar os resultados, entre os quais o aumento do número de amostras, exclusão de *outliers*.

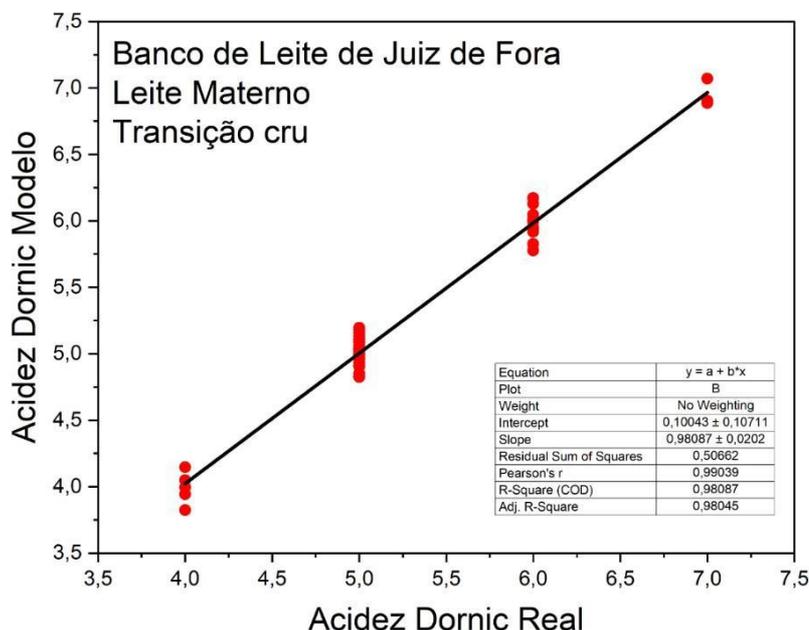
Figura 26: Método dos mínimos quadrados parciais para quantificar Kcal no leite humano.



Fonte: Elaboração Própria.

A figura 28 mostra o resultado do ajuste para a acidez Dornic do leite humano. Neste caso, os resultados foram melhores, se comparados aos do valor nutricional, com $R^2=0.98$. Além disso, observa-se que a grandeza *slope* tem valor de 0.98, o que também é um indicador da qualidade do modelo. Na situação ideal, o *slope* deve se aproximar de 1.

Figura 27: Método dos mínimos quadrados parciais para quantificar Acidez no leite humano.



Fonte: Elaboração Própria.

Assim, é possível afirmar que espectroscopia infravermelha apresentou sensibilidade para quantificar as propriedades analisadas, conseguindo acusar amostras que não estariam dentro do padrão.

6. CONCLUSÃO

As análises espectrais juntamente com os cálculos das intensidades relativas das bandas de lipídios, proteínas e lactose, mostraram uma variabilidade de concentrações das biomoléculas entre as amostras de leite obtidas em BLH, antes e depois do processamento/pasteurização. Dessa forma, viu-se a necessidade das análises do PCA e do método dos quadrados mínimos, onde chegamos à conclusão que não foi constatado que a pasteurização estaria alterando os componentes do leite, existindo a necessidade de um outro estudo com mais amostragem. Contudo, outras conclusões relevantes foram obtidas:

- A técnica de infravermelho por transformada de Fourier se mostrou capaz de identificar amostras fora do padrão.

- A técnica foi capaz de diferenciar estágios diferentes do leite humano (colostró, transição e maduro).

- Foi possível obter dados preliminares que indicam que o infravermelho por transformada de Fourier pode estabelecer correlações quantitativas entre espectros e acidez Dornic e também o valor nutricional.

Em resumo, a técnica de espectroscopia no Infravermelho se mostrou bastante útil para analisar as amostras de leite humano bem como estimar as propriedades do leite em acidez e Kcal. Também apresentou sensibilidade para diferenciar as fases do leite humano. Sugere-se o seguinte trabalho para o futuro: fazer uma comparação das análises em espectroscopia infravermelha com métodos tradicionais de determinação de proteína, carboidrato e lipídeos em leite humano.

REFERÊNCIAS

ABRANCHES, A. D. et al. **Efeito do congelamento e descongelamento nos níveis de gordura, proteína e lactose do leite humano natural administrados por gavagem e infusão contínua.** Artigos Originais. J. Pediatr. (Rio J.) 90 (4). Jul-agosto 2014.

ALMEIDA, J. A. G. **Banco de Leite Humano Funcionamento, prevenção e Controle de Riscos.** 1ª edição. Brasília: Editora Anvisa, 2008.

ALMEIDA, J. A. G. NOVAK, F. R. GUIMARÃES, V. **Leite Humano Ordenhado: Determinação do Crematócrito.** BLH-IFF/NT-30.11. 2011. Disponível em: https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/79/nt_30.11_determinacao_crematocrito_lho.pdf. Acesso em 14 de dezembro 2021.

ALMEIDA, J. A. G. NOVAK, F. R. GUIMARÃES, V. **Teste Simplificado para Detecção de Coliformes Totais.** BLH-IFF/NT- Set. 2011. Disponível em: https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/98/nt_40.11_teste_simplificado_detec_colif_totais.pdf. Acesso em 30 de Junho 2022.

ALMEIDA, Filipa Margarida Neves. **Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril.** p. 84, 2009.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2008.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 5 set. 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 15 de setembro 2021.

ARSLANOGLU, S. *et al.* Donor human milk for preterm infants: Current evidence and research directions. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 57, n. 4, p. 535–542, 2013.

ÁZQUEZ-ROMÁN, S. *et al.* Medida por crematócrito del contenido calórico de la leche materna donada congelada. In: **Anales de Pediatría.** Elsevier Doyma, p. 185-188, 2014.

BALLARD, O., MORROW A. L., Human milk composition: Nutrients and Bioactive Factors. **Pediatric Clinics North America.** Volume 60. Página 49- 74. 2013.

BARRETO, L. A., FUJII, T. M. M. Leite Humano como regulador epigenético. **Revista Brasileira de Nutrição.** Volume 44. Página 8-14. 2019.

BARTH, Andreas. **Infrared spectroscopy of proteins.** *Biochimica et Biophysica Acta* v. 1767, p. 1073–1101, 2007.

BERTINO, E. *et al.* Effect of prolonged refrigeration on the lipid profile, lipase activity, and oxidative 68 status of human milk. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 56, n. 4, p. 390-396, 2013.

BORGES, C. P. G. et al. **Valor calórico do leite humano ordenhado pasteurizado de um banco de leite de Dourados-MS.** Braz. J. of Develop., Curitiba, v. 6, n. 3, p. 14243-14258, mar.2020. ISSN 2525-8761.

BORGO, Luiz Antônio. **Efeitos da pasteurização e do congelamento sobre a fração lipídica do leite humano.** 2011. 139 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Ciências da Saúde, Universidade de Brasília Faculdade de Ciência da saúde, Brasília, 2011.

BRAGA, L. P. M. PALHARES, D. B. **Efeito da evaporação e pasteurização na composição bioquímica e imunológica do leite humano.** Artigos Originais. J. Pediatr. (Rio J.) 83 (1). Fev 2007. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572007000100011>

BRASIL. Governo do. **Brasil é Referência em Doação de Leite Humano.** 2020. <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2020/02/brasil-e-referencia-em-doacao-de-leite-humano>. Acesso em 08 de dezembro 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana de Saúde. Dez passos para uma alimentação saudável, guia alimentar para crianças menores de 2 anos. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2002. 45 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Atenção humanizada ao recém-nascido de baixo peso: Método Canguru.** 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2011b.

BRUKER OPTICS. **Introduction to FT-IR spectroscopy - OPUS Spectroscopic Software.** [S.l.]: Bruker Optik GmbH, 2014.

CALIL, V. M. L. T. *et al.* **Banco de Leite Humano: Características do Leite do Banco de Leite Humano.** Pág. 59 – 82. 1ª edição. São Paulo. Editora Atheneu, 2011.

CAMPESTRINI, E. Utilização de equipamentos NIRS (Near infrared reflectance spectroscopy) nos estudos de valores nutricionais (composição química e digestibilidade) de alimentos para não ruminantes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n.5, p.240-251, 2005.

CARVALHO, H. C., SILVEIRA, J. L. C.; LIMA, C. J., BORGES, M. E., DIAS, P. MENDONÇA, Z. Desenvolvimento de um sistema para homogeneização do leite humano durante seu processo de pasteurização. XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 2008.

COVAS, M. C., *et al.* Almacenamiento de leche humana: su influencia en la composición química y desarrollo bacteriano en tres momentos de la lactancia. **Arch Argent Pediatr.** 2000; 98: 92-98.

DUFOUR, Éric. Principles of Infrared Spectroscopy. In: SUN, Da-Wen (Org.). **Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control.** 1. ed. National University of Ireland, Dublin: Elsevier Inc., 2009. p. 3–26. 9780123741363.

ESCUDEIR-VIECO, D. *et al.* **Effect of HTST and holder pasteurization on the concentration of immunoglobulins, growth factors, and hormones in donor human milk.** **Front Immunol.** 2018; 9:2222. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02222>

FACKLER, K.; SCHWANNINGER, M. **How spectroscopy and microspectroscopy of degraded wood contribute to understand fungal wood decay.** *Applied microbiology and biotechnology*, v. 96, n. 3, p. 587-599, 2012.

FALCÃO, T. J. R. et al. **Emerging technologies and microbiological safety of human milk** **Tecnologías emergentes y seguridad microbiológica de la leche maternal.** *Research, Society and Development*, v. 10, n. 15, 2021. ISSN 2525-3409. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i15.22645>.

FAVARETTO, M. et al. **Composição lipídica e proteica do leite humano pré e pós pasteurização.** *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.17 n.4, out. - dez. /2016 - ISSN 1518-8361.

FERREIRA, C. K. M. et al. Composição do Leite Humano e sua Relação com a Nutrição Adequada à Recém-Nascidos Pré-Termos. **Temas em Saúde**, João Pessoa, v.17, n. 1, p. 118-146, 2017. Mensal. Disponível em: <https://temasemsaude.com/wp-content/uploads/2017/05/17109.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2021.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Normas Técnicas para Bancos de Leite Humano.** 2005 a. Acessado 11 de Novembro de 2021. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/redeblh>.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Programa Nacional de Qualidade em Bancos de Leite Humano.** Rio de Janeiro, 2003.

FORATO, L. A. *et al.* **A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações.** Embrapa Instrumentação. São Paulo. 2010.

FUNDAÇÃO ABRINQ. **Comitê de mortalidade infantil: entenda como a prática pode contribuir para zerar as mortes evitáveis de crianças.** 2021. Acessado 17 de Junho de 2022. Disponível em: <https://www.fadc.org.br/noticias/entenda-a-importancia-do-comite-de-mortalidade-infantil>

GALHARDO, A. N. S. M., *et al.* Acidez Dornic como parâmetro de qualidade em bancos de leite humano. **Hig Alim.** 2002; 16: 16-27.

GAO, C. *et al.* Changes to breast milk fatty acid composition during storage, handling and processing: A systematic review. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 146, p. 1-10, 2019.

GARCÍA-LARA, N. R. *et al.* Effect of freezing time on macronutrients and energy content of breastmilk. **Breastfeeding Medicine**, v. 7, n. 4, p. 295-301, 2012.

GARCÍA-LARA, N. R. *et al.* Effect of Holder pasteurization and frozen storage on macronutrients and energy content of breast milk. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 377-382, 2013.

HECK, A. R. **Banco de Leite Humano: Características do Leite do Banco de Leite Humano.** Pág. 59 – 82. 1ª edição. São Paulo. Editora Atheneu, 2011.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental.** Tradução para o português: CÉLIO PASQUINI et al. [Coord.]. 6ª ed. Porto Alegre. 2009.

INSTITUTE OF MEDICINE. 1991. **Nutrition During Lactation.** Washington, DC: The National Academies. Press. <https://doi.org/10.17226/1577>.

JONES, E. E., DECHERNEY, A. H. Fertilization, pregnancy and lactation. **In Medical Physiology**. Página 1167-89. 2005.

KOLETZKO. **Human Milk Lipids**. Human Milk: Lessons from Recent Research. *Ann Nutr Metab*; 69(suppl 2):28–40, 2017. DOI: 10.1159/000452819

KRAUSE: **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. L. Kathleen Mahan, Sylvia EscottStump; [tradução Andréa Favano]. 11 ed. _ São Paulo: Roca, 2005.

LAMOUNIER, J. A; VIEIRA, G. O; GOUVÊA, I. C. Composição do Leite Humano: Fatores nutricionais. In: REGO, J. D. **Aleitamento Humano**. São Paulo: Atheneu,2009.

LARA, N. R. G. et al. Effect of Freezing Time on Macronutrients and Energy Content of Breastmilk. **Rev. Breastfeed Med**. 2012 Aug; 7(4): 295–301. DOI: [10.1089/bfm.2011.0079](https://doi.org/10.1089/bfm.2011.0079)

LEITE, A. G. Z. FEFERBAUM, R. **Dinâmica da Composição do Leite Humano e suas Implicações Clínicas: Proteômica do Leite Humano**. Volume 8. São Paulo: Editora ILSI – Internacional Life Sciences Institute, 2018.

LEITE, D. O. PRADO, R. J. Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 2, 2504. 2012.

LIRA, B. F. CRUZ, E. **Banco de Leite Humano Funcionamento, prevenção e Controle de Riscos: Estocagem**. Pág. 105 – 110. 1ª edição. Brasília: Editora Anvisa, 2008.

LORENÇONI, M. F. *et al.* Effect of pasteurization on the antioxidant and oxidant properties of human milk. Original article. **Rev. paul. pediatr.** 39. 2021. <https://doi.org/10.1590/1984-0462/2021/39/2019165>

MANTSCH, H. H.; CHAPMAN, D. **Infrared Spectroscopy ob Biomolecules**. **John Wiley & Sons**, 1996, 203p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Biblioteca Virtual em Saúde. 17/11/2021 - Dia Mundial da Prematuridade: Separação Zero: Aja agora! Mantenha pais e bebês prematuros juntos. Acesso em: 22 de julho de 2022. Disponível em: <https://bvsm.sau.gov.br/17-11-dia-mundial-da-prematuridade-separacao-zero-aja-agora-mantenha-pais-e-bebes-prematuros-juntos/>

MOLINARI, C. E. et al. **Proteome Mapping of human skim milk proteins in term and preterm milk**. *J. Proteome Res.* 2012, 11, 1696-714.

MONTENEGRO, C. A. B; REZENDE FILHO, J. **Rezende, obstetrícia fundamental**. MOURA, E. C. **Nutrição: composição do leite humano na gestação a termo e pré-termo. Amamentação: Bases científicas para a prática profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 60-87, 2002.

NOVAK, F. R. ALMEIDA, J. A. G. **Banco de Leite Humano: Controle de Qualidade em Bancos de Leite Humano**. Pág. 47- 58. 1ª edição. São Paulo. Editora Atheneu, 2011.

NUNES, L. M. Importância do aleitamento humano na atualidade. **Boletim Científico de Pediatria**. Número 3. Volume 4. Página 55-58. 2015.

OLIVEIRA, B. M. Perfil das lactantes que procuram o Banco de leite humano de Juiz de Fora. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BANCOS DE LEITE HUMANO ABC/ Fiocruz, 5., 2010 Brasília/DF. **Anais.**, 28 a 30 de setembro de 2010, Brasília/ DF, 2010. P. 18-19.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 2019. **Donor human milk for low-birth-weight infants**. https://www.who.int/elena/titles/donormilk_infants/en/

PREFEITURA DE JUIZ DE FORA. **Banco de leite humano de Juiz de fora comemora 30 anos**. 2021. Portal de Notícias. Disponível em: pjf.mg.gov.br/noticias/view.php?modo=link&idnoticia2=70771. Acesso em: 20 set. 2021.

QUINTAL, V. S. CALIL, V. M. L. T. **Dinâmica da Composição do Leite Humano e suas Implicações Clínicas: Proteômica do Leite Humano**. Volume 8. São Paulo: Editora ILSI – Internacional Life Sciences Institute, 2018.

RECHE, A. N. **Análise espectroscópica no infravermelho do leite humano cru e processado/pasteurizado de banco de leite**. Orientador: Kumiko koibuchi sakane. 2013. Dissertação (mestrado) - curso de pós-graduação em bioengenharia, mestrado profissional em bioengenharia., Universidade do vale do Paraíba, São José dos Campos, 2013.

RODRIGUES, L. do N. **Espectroscopia por FTIR de variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados para a produção de etanol celulósico**. 2012. 143f. Dissertação (Mestrado em física) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

SANTOS, P. M. et al. Utilização da microespectroscopia infravermelha (FT-IR) para teste de algoritmos estatísticos na diferenciação dos micro-organismos *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*. **Revista Brasileira de Engenharia Biomedica** v. 28, n. 4, p. 398–409, 2012.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X; KIEMLE, David J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

SIMAS, R. C. **Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia de infravermelho próximo**. Universidade Estadual de Campinas, 2005.
SOUZA, P. P. R., SILVA, J. A. Monitoramento da qualidade do leite humano ordenhado e distribuído em banco de leite de referência. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. São Paulo, 2010; 69 (1): 7-14.

STUART, B. **Biological Applications of infrared Spectroscopy**. Baffins Lane: John Wiley & Sons, 1997.

SUCENA, L. P., FURLAN, M. F. The incidence of maternal breastfeeding in a neonatal intensive care unit and the newborns' characteristics. **Arq. Cienc. Saúde**, v.15, p.82-9, 2008.

UNICEF. **Aleitamento humano**. 2020. Disponível em <
<https://www.unicef.org/brazil/aleitamento-humano>> Acesso em: 09 de dezembro 2021.

VIEIRA, A. A. *et al.* Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. **Early Human Development**, v. 87, n. 8, p. 577–580, 2011.

VIEIRA, A. A. *et al.* Análise do conteúdo energético do leite humano administrado a recém-nascidos de muito baixo peso ao nascimento. **J Pediatr.** (Rio J). 2004;80(6):490-4.

VINAGRE, R. D. DINIZ, E. M. A. **O Leite Humano e sua Importância na Nutrição do Recém-nascido Prematuro**. 1º edição. São Paulo. Editora Atheneu, 2001.

WESOLOWSHA, A. *et al.* **Innovative techniques of processing human milk to preserve key components.** *Nutrients.* 2019; 11: E1169. <https://doi.org/10.3390/nu1105116>.