

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
LEITE E DERIVADOS

Carolina Carvalho Ramos Viana

**CARACTERIZAÇÃO DE FÓRMULAS INFANTIS PARA
LACTENTES USANDO ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO MÉDIO**

JUIZ DE FORA
2018

CAROLINA CARVALHO RAMOS VIANA

**CARACTERIZAÇÃO DE FÓRMULAS INFANTIS PARA
LACTENTES USANDO ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO MÉDIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria José Valenzuela Bell

Co-orientador: Prof Dr Paulo Henrique Fonseca da Silva

Juiz de Fora
2018

CAROLINA CARVALHO RAMOS VIANA

Viana, Carolina Carvalho Ramos.

Caracterização de Fórmulas Infantis para Lactentes usando Espectroscopia no Infravermelho médio / Carolina Carvalho Ramos Viana. -- 2018.

99 p.

Orientadora: Maria José Valenzuela Bell

Coorientador: Paulo Henrique Fonseca da Silva

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, 2018.

1. FT-MIR-ATR. 2. Lácteos. 3. PCA. 4. PLS. 5. Nutrição infantil. I. Bell, Maria José Valenzuela, orient. II. Silva, Paulo Henrique Fonseca da, coorient. III. Título.

CAROLINA CARVALHO RAMOS VIANA

**Caracterização de Fórmulas Infantis para Lactentes por
Espectroscopia no Infravermelho Médio**

Carolina Carvalho Ramos Viana

Dra Maria José Valenzuela Bell:

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

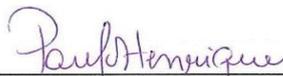
Aprovada em 27 de março de 2018



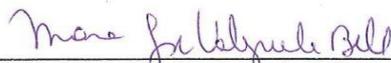
Dra. Isis Rodrigues Toledo Renhe



Dr. Italo Tuler Perrone



Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva



Dra Maria José Valenzuela Bell

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida avó, Eliene, quem sempre me impulsionou a continuar os estudos, investir no conhecimento. Tenho certeza que de lá pertinho do Pai ela está me olhando e sorrindo comigo.

Vó, esta vitória é pra você!!! Saudades eternas!!

Dedico também ao meu filho Carlos Eduardo, para que ele continue estudioso e esteja sempre em busca do —aprenderll.

AGRADECIMENTOS

À EPAMIG/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, nas pessoas da Coordenadora de Ensino Regina Célia Mancini e do Chefe Geral prof. Cláudio Furtado Soares, pela liberação, incentivo e confiança para que eu pudesse participar do mestrado.

Ao grupo do Laboratório de Espectroscopia de Materiais, com destaque ao Professor Virgílio e à Professora Maria José Valenzuela Bell. A ela, a minha eterna gratidão pela oportunidade, apoio, confiança e por possibilitar este trabalho, além de toda experiência adquirida, mesmo diante de tanta dificuldade e falta de tempo para me dedicar. Aos colegas Jonathan, Cristina e Thamiris, por todo apoio, orientações, críticas e ajuda. Este trabalho não teria a mesma qualidade sem vocês!

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e ao programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados (parceria EPAMIG, EMBRAPA e UFJF), pela oportunidade de realização do curso. Em especial a FADEPE, pela aquisição das amostras.

Aos professores/pesquisadores, representados pela prof./pesquisadora Elisângela Michele Miguel, que me permitiram utilizar as dependências do Laboratório de Pesquisa do ILCT, e em especial às funcionárias Alcy e Rosalina, que muito me auxiliaram nas análises realizadas.

Às colegas do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, professoras Isis Renhe, Martha Bessa e Maria Tereza Cratiú, e às alunas Olívia Coelho, Fernanda Campos e Rafaela Brito, por estarem incansáveis ao meu lado no preparo de amostras e análises físico-químicas.

Ao meu filho Carlos Eduardo, que não só me apoiou entendendo as minhas ausências e, às vezes a pouca atenção, mas também quis me ajudar, pesando e preparando soluções para as minhas análises.

Ao José Carlos, meu companheiro e amigo, que dividiu comigo a ansiedade, as dificuldades, os erros e acertos, as análises e atividades deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram à minha formação, o meu sincero agradecimento!

*“[...] Não é sobre chegar ao topo do mundo e saber que venceu,
é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu[...].”*

Ana Carolina Vilela da Costa

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo geral a utilização da Espectroscopia na região do Infravermelho Médio, aliada à calibração multivariada (PCA e PLS) para caracterizar e quantificar a composição majoritária de fórmulas infantis. Foram avaliadas 20 marcas comercializadas em Juiz de Fora (MG), de quatro grandes indústrias do ramo. Determinou-se a composição majoritária das amostras (teor de lipídios, proteína verdadeira, carboidratos, umidade, sólidos totais e cinzas) por meio de métodos físico-químicos, em duplicata, de acordo com metodologias oficiais de análise, sendo que os resultados, em geral, atendem a legislação vigente. Em acréscimo, foi realizada a avaliação espectroscópica das formulações, na região MIR de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . Utilizando-se de ferramentas estatísticas, foi possível interpretar os espectros gerados e caracterizar a composição das fórmulas infantis testadas, em comparação às principais alegações descritas no rótulo e da literatura. As proposições sugeridas foram confirmadas pelo comportamento das amostras destas frente à Análise dos Componentes Principais (PCA), e a partir disto, pode-se dizer que a espectroscopia FT-MIR-ATR foi capaz de caracterizar as diferentes formulações testadas, quando aliada a estatística multivariada. Já em relação à Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), somente foi encontrada correlação entre os dados físico-químicos e os espectros MIR no intervalo entre 1400 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} , e por isso, este foi utilizado para as previsões dos valores analíticos. Por ser a região característica da absorção de carboidratos, o modelo apresentou os melhores resultados na predição do teor deste componente, com perfil de curva de calibração e ao mesmo tempo, apresentou predições ruins para o restante dos atributos testados. Sugere-se que o modelo possui potencial para as predições físico-químicas, em especial para carboidratos, caso sejam efetuadas curvas de calibração para este tipo de matriz alimentar.

Palavras-chaves: FT-MIR-ATR. Lácteos. PCA. PLS. Nutrição infantil.

ABSTRACT

This work focuses on the use of Fourier Transformed Mid Infrared Spectroscopy (FT-MIR) coupled to Attenuated Total Reflectance (ATR), combined with multivariate calibration as Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares (PLS) to characterize and quantify the majority composition of infant formulas. Twenty trademarks marketed in Juiz de Fora (MG) were evaluated from four different industries. The majority composition of the samples (lipid content, true protein, carbohydrates, moisture, total solids and ashes) was determined by physicochemical methods, in duplicate, according to official analysis methodologies. The results, in general, comply with current legislation. On the other hand, the spectroscopic evaluation of the formulations was performed in the MIR region from 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} . Using statistical tools, it was possible to interpret the generated spectra and characterize the composition of the infant formulas tested, in comparison to the main claims described in the labels and in the literature. The suggested propositions were confirmed by the behavior of these samples when compared to PCA. It can be said that FT-MIR-ATR spectroscopy was able to characterize the different formulations tested, when allied to multivariate statistics. In relation to the Regression by PLS, only a correlation was found between physicochemical data and MIR spectra in the interval between 1400 cm^{-1} and 1000 cm^{-1} , and therefore, it was used for the predictions of the analytical values. Because it is the characteristic region of carbohydrate absorption, the model presented the best results in the prediction of the content of this component, with a calibration curve profile and at the same time presented bad predictions for the rest of the attributes tested. It is suggested that the model has potential for physicochemical predictions, especially for carbohydrates, if calibration curves are made for this type of food matrix.

Key-words: FT-MIR-ATR. Dairy products. PCA. PLS. Infant nutrition

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Regiões espectrais de importância analítica	43
Figura 2 - Representação dos diferentes tipos de vibrações moleculares.....	45
Figura 3- Esquema de Funcionamento da Transformada de Fourier	46
Figura 4- Esquema de funcionamento do acessório ATR.....	48
Figura 5 – Esquema da projeção de dados de uma matriz de espectros NIR-FT por Análise dos Componentes Principais (PCA)	54
Figura 6 – Representação esquemática das matrizes X e Y no desenvolvimento do método PLS	55
Figura 7- Espectros característicos do FT-MIR-ATR das diferentes fórmulas infantis estudadas	71
Figura 8- Espectros do FT-MIR de cada categoria e suas principais bandas de absorção	72
Figura 9 – Score plot tridimensional da análise dos componentes principais das amostras de fórmulas infantis na região MIR (de 3028 cm^{-1} a 2815 cm^{-1} e de 1780 cm^{-1} a 1000 cm^{-1}).....	74
Figura 10- Espectros FT-MIR-ATR das fórmulas infantis aproximados na região de absorção característica de lipídios.	75
Figura 11 - Análise de componentes principais dos espectros das amostras avaliadas na região MIR característica de lipídios (3000 cm^{-1} a 2780 cm^{-1} e de 1820 cm^{-1} a 1700 cm^{-1})	77
Figura 12- Espectros FT-MIR das fórmulas infantis aproximados na região de absorção característica de proteínas (1700 cm^{-1} a 1510 cm^{-1}).....	79
Figura 13- Score plot da análise dos componentes principais dos dados de FT-MIR na região característica de absorção das proteínas.	81
Figura 14 – Loading plot – Influência de cada variável nas amostras testadas	82
Figura 15- Espectros FT-MIR das fórmulas infantis aproximados na região de absorção característica de carboidratos	83
Figura 16 - Análise dos componentes principais, em três dimensões, dos dados de FT-MIR na região característica de absorção dos carboidratos.....	84
Figura 17 – Gráfico de pesos da matriz X (dados MIR) em relação ao modelo de predição	87

Figura 18 – Calibração e previsões para validação do modelo PLS para os atributos: em $\text{g}\cdot 100\text{kcal}^{-1}$ (A) lipídios; (B) proteínas; (C) carboidratos; (D) cinzas; em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (E) sólidos totais; (F) umidade..... 89

Figura 19: Estimativa de erro de previsão para os conjuntos de dados de calibração e validação do modelo PLS para os atributos: em $\text{g}\cdot 100\text{kcal}^{-1}$ (A) lipídios; (B) proteínas; (C) carboidratos; (D) cinzas; em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (E) sólidos totais; (F) umidade..... 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Teores médios de macronutrientes no leite humano maduro e leite de vaca	21
Tabela 2- Composição média do leite humano e do leite de vaca.....	22
Tabela 3 – Composição protéica média do leite humano e de vaca.....	25
Tabela 4- Composição das Fórmulas Infantis segundo a Legislação vigente ..	32
Tabela 5- Nutrientes do leite humano, leite de vaca e fórmulas infantis	33
Tabela 6- Recomendações para micronutrientes das Fórmulas Infantis pela ESPGHAN e Legislação Brasileira	34
Tabela 7- Regiões espectrais do infravermelho	44
Tabela 8- Regiões espectrais do infravermelho e suas principais aplicações..	44
Tabela 9 – Codificação lotes e alegações das amostras utilizadas	60
Tabela 10 – Composição centesimal média das amostras avaliadas.....	67
Tabela 11 – Composição média das amostras avaliadas (três lotes)	68
Tabela 12 - Composição média das amostras avaliadas (dois lotes)	68
Tabela 13 - Porcentagem da variância calculada pela análise de componentes principais utilizando parte dos espectros nas faixas de número de ondas compreendida entre 3028 cm^{-1} a 2815 cm^{-1} e de 1780 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} ..	73
Tabela 14 – Coeficientes obtidos relacionando matriz X e Y no PLS	88
Tabela 15 – Dados reais, preditos e erros para a predição do teor de carboidratos das amostras testadas	92

LISTA DE ABREVIações

ARA	Ácido Araquidônico
Art	Artigo
APLV	Alergia a Proteína do Leite de Vaca
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais
ANOVA	Análise de Variância
ATR	Reflectância Total Atenuada
CP	Componente Principal
cm ⁻¹	Inverso do centímetro
DHA	Ácido docohexaenoico
ESPGHAN	Sociedade Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica
EUA	Estados Unidos da América
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
FADEPE	Fundação de Apoio e Desenvolvimento ao Ensino, Pesquisa e Extensão
FDA	do inglês Food and Drug Administration
FI	Fórmula Infantil para Lactentes
FIS	Fórmula Infantil e de Seguimento para Lactentes
FS	Fórmula de Seguimento para Lactentes
FOS	Frutoligossacarídeos
FT	Transformada de Fourier
FT-MIR	Espectroscopia no Infravermelho Médio com Transformada de Fourier
FT-MIR-ATR	Espectroscopia no Infravermelho Médio com Transformada de Fourier acoplado à Reflectância Total Atenuada

FT-NIR	Espectroscopia no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier
g	Grama
GOS	Galactoligossacarídeos
HMA	Analisador de Leite Humano
FIL	Federação Internacional de Laticínios
kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
kJ	QuiloJoule
Ig	Imunoglobulina
IV	Infravermelho
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
µg	Micrograma
MIR	Infravermelho Médio
mL	Mililitro
µm	Micrômetro
MS	Ministério da Saúde
NIR	Infravermelho Próximo
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCA	do inglês <i>Análise por Componentes Principais</i>
PLS	do inglês <i>Regressão de Mínimos Quadrados Parciais</i>
PUFA	Ácidos Graxos Poli-insaturados
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	do inglês <i>Erro Relativo</i>
RMF	Resíduo Mineral Fixo

RMSE do inglês *Raiz Quadrada do Erro quadrático Médio*

SIgA Imunoglobulina Secretória

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	O Leite Materno	20
2.1.1	A Composição do Leite Materno	20
2.2	Fórmulas Infantis para lactentes	28
2.2.1	Histórico do uso de substitutos do leite materno	28
2.2.2	Definições e composição segundo a Legislação Brasileira	30
2.2.3	Composição das Fórmulas Infantis	32
2.2.4	Variações das fórmulas infantis de acordo com dietas específicas	36
2.3	Espectroscopia na região do infravermelho	42
2.3.1	Princípios e definições	42
2.3.2	A Espectroscopia na região do Infravermelho Médio, com Transformada de Fourier (FT-MIR)	46
2.3.3	Aplicações na Indústria de Alimentos.....	49
2.4	Análise de dados.....	52
2.4.1	Análise por Componentes Principais	53
2.4.2	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais	55
3	OBJETIVOS	58
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1	Obtenção e codificação das amostras	59
4.2	Análise físico-químicas das amostras por métodos convencionais	60
4.2.1	Determinação de gordura por método de Gerber	61
4.2.2	Determinação de proteína verdadeira por método de Kjeldahl.....	61
4.2.3	Determinação de umidade por método gravimétrico em estufa.....	64
4.2.4	Determinação de Resíduo Mineral Fixo (cinzas)	65
4.2.5	Determinação de carboidratos por diferença centesimal.....	65
4.3	Análise das amostras por Espectroscopia no infravermelho médio (FT-MIR- ATR).....	65
4.3.1	Análise estatística.....	66

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1	Caracterização físico-química das fórmulas infantis por métodos convencionais	67
5.2	Caracterização das amostras por Espectroscopia no infravermelho médio (FT-MIR- ATR)	70
5.2.1	Região MIR característica dos lipídios	75
5.2.2	Região MIR característica de proteínas	78
5.2.3	Região MIR característica de carboidratos	82
5.3	Predição de valores físico-químicos a partir dos espectros FT-MIR	
	86	
6	CONCLUSÃO.....	93
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	94
8	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

A alimentação correta no primeiro ano de vida é de extrema importância para o desenvolvimento da criança, uma vez que irá influenciar em grande parte seu futuro (FERREIRA, 2005). O leite materno é o tipo de alimentação mais adequado para o recém-nascido e lactente por ser capaz de suprir todas as necessidades nutricionais durante os primeiros seis meses de vida, permitindo que ele permaneça em aleitamento materno exclusivo (CALIL; FALCÃO, 2003).

Em casos nos quais alimentação no seio materno não é possível, tanto em razões relacionadas à mãe quanto ao lactente faz-se necessária a utilização de fórmulas infantis. Dentre os fatores que afetam a amamentação pode-se citar, por exemplo, infecção materna por agentes que podem ser transmitidos pelo leite, exposição materna à fármacos ou a agentes ambientais, recusa ou impossibilidade de amamentar, bem como aumento ponderal inadequado do lactente, além de alguma patologia relacionada à criança, entre outros (FERREIRA, 2005).

Diante deste cenário, a composição do leite humano vem sendo usada há algumas décadas como modelo para preparação de fórmulas de alimentação infantil, a partir do leite de vaca. Denominadas *-baby foods* ou *-infant formulas*”, estas são divididas em Fórmulas para Lactentes (indicadas do nascimento até 6 meses) e Fórmulas de Seguimento (dos seis meses aos 12 meses de idade).

Segundo Ferreira (2005), a respeito dos componentes majoritários, a indústria vem praticando desde a década de 1960, modificações na composição do leite de vaca para tornar as fórmulas infantis mais próximas do materno. O objetivo inicial da composição da fórmula infantil era torná-la semelhante à do leite humano, o que não é atingido devido à diferente digestibilidade e biodisponibilidade entre seus nutrientes (LÖNNERDAL, 2014). Tais modificações consistem principalmente na redução do teor proteico, obtido principalmente pela diminuição de caseínas; substituição da gordura, para alterar a relação ácidos graxos saturados/insaturados; adição de lactose; redução de sais minerais; suplementação vitamínica e de ferro (CAMPOS *et al.*, 2008).

Visto à grande frequência de utilização das Fórmulas Infantis e às diversas adaptações que visam garantir que a formulação seja adequada como única e segura fonte de nutrientes, é de extrema importância a avaliação da qualidade destes produtos, principalmente buscando observar se as alegações declaradas nos rótulos e propagandas são condizentes com sua composição.

Os alimentos são apontados como matrizes de difícil análise, devido à complexidade da sua constituição orgânica. Em consequência, não existe um único método analítico oficial capaz de determinar sua composição centesimal, sendo necessário dosear isoladamente cada componente. Comumente realiza-se, principalmente, o doseamento de proteínas, carboidratos, lipídios, cinzas, sólidos totais e umidade, podendo-se ter ainda a determinação do teor de fibras e de outros componentes mais específicos (LUTZ, 2008).

Na maioria dos casos, as técnicas oficiais caracterizam-se por metodologias longas, de natureza destrutiva em relação à amostra e que demandam tempo e gastos de reagentes químicos. Para tanto, faz-se necessário além de um laboratório bem equipado e com descarte adequado de resíduos, analistas devidamente treinados, de forma a fornecer segurança analítica e ambiental.

Os métodos oficiais de análise físico-químicas são regulamentados, entre outros órgãos, pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), e no Brasil, na área da bromatologia, tem-se como referência as metodologias analíticas descritas segundo o Instituto Adolf Lutz, reconhecido internacionalmente por sua competência em pesquisas laboratoriais e na vigilância epidemiológica, sanitária e ambiental requerida (LUTZ, 2008).

Com tantos avanços tecnológicos na ciência dos alimentos, é constante a necessidade de modernização e atualização dos métodos analíticos, principalmente aqueles capazes de determinar de forma mais simples e rápida, a presença ou teor de analitos presentes em concentrações muito baixas, de modo a atender às novas exigências legais quanto à qualidade e segurança de alimentos. Neste sentido, novas técnicas instrumentais, baseadas em princípios físicos e químicos, são frequentemente desenvolvidas. Dentre os métodos físicos, destacam-se os baseados na espectroscopia na região do infravermelho. São métodos mais rápidos na medição de matrizes complexas, sem geração de resíduos, e na maioria das vezes dispensam tratamento prévio

da amostra. Além disso, quando aliados à ferramentas estatísticas, são capazes de promover a identificação, qualificação e quantificação de compostos orgânicos nos alimentos, a partir de um único espectro (CAMPESTRINI, 2005).

Após exposição das informações anteriores, com o alto índice de substituição do aleitamento materno por Fórmulas Infantis, nota-se a grande importância dos estudos da composição destas formulações. Estudos relacionados à quantificação dos componentes, em especial, de proteínas nestes produtos são escassos. A maioria das pesquisas apenas aborda rotulagem ou avalia teoricamente a quantidade de nutrientes exigida pelas legislações vigentes, sem compará-los com os teores obtidos analiticamente.

A utilização da espectroscopia na região do infravermelho, em conjunto com análises multivariadas, leva a caracterização rápida e ao desenvolvimento de metodologias analíticas com robustez e confiabilidade necessárias para garantia da qualidade. Dessa forma, a hipótese deste trabalho consiste em utilizar a espectroscopia FT-MIR, combinadas à ferramentas estatísticas para avaliar e prever a composição de diferentes fórmulas infantis disponíveis ao consumidor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Leite Materno

O leite materno é considerado o alimento ideal para o recém-nascido, uma vez que, quando produzido por mães saudáveis é suficiente para suprir todas as suas necessidades nutricionais nos primeiros seis meses de vida. Possui uma composição balanceada, de fácil digestão, que inclui todos os nutrientes essenciais, além de aproximadamente 45 tipos diferentes de fatores bioativos, que contribuem para o crescimento e desenvolvimento do recém-nato, bem como para a maturação de seu trato gastrointestinal. Dentre eles destacam-se fatores antimicrobianos, agentes anti-inflamatórios, enzimas digestivas, vários tipos de hormônios e fatores de crescimento (CALIL; FALCÃO, 2003).

Os inúmeros benefícios do aleitamento materno para o organismo infantil incluem aspectos higiênicos, imunológicos, psicossociais e cognitivos, além de prevenção de doenças futuras. As vantagens nutricionais estendem-se à adaptação do leite materno à relativa insuficiência transitória digestiva e renal do recém-nascido e também à evolução das suas necessidades, por meio de mudanças na sua composição com o decorrer da lactação, permitindo um crescimento harmonioso do lactente (FERREIRA, 2005).

O ato de amamentar pode trazer benefícios à mãe, como a redução do sangramento transvaginal pós-parto e a prevenção de doenças diversas, além de estimular o desenvolvimento da musculatura orofacial da criança e desenvolver um maior vínculo entre a mãe e o filho (FERREIRA, 2005). Por isso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a amamentação materna de forma exclusiva durante os primeiros seis meses de vida (CAMPOS *et al.*, 2008).

2.1.1 A Composição do Leite Materno

A composição química do leite materno varia de acordo com o tempo de amamentação, de modo a se adaptar às necessidades fisiológicas da criança. Assim, pode ser classificado de acordo com o estágio de lactação, como: colostro, de transição e maduro. O colostro é o primeiro leite excretado, obtido em média até o sétimo dia após o parto; o leite de transição é o produto

intermediário, obtido em média do sétimo ao 15º dia após o parto, e o leite maduro, aquele produzido, em média partir do 15º dia após o nascimento, contém os nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento psicomotor da criança (RECHE, 2013).

Comparado ao leite maduro, o colostro é mais viscoso, possui maiores concentrações de proteínas, minerais e vitaminas lipossolúveis, particularmente A, E e carotenóides, bem como menores quantidades de lactose, gorduras e vitaminas do complexo B. Seu conteúdo energético oscila em torno de 58 kcal·100mL⁻¹, em contraste com as 71kcal·100mL⁻¹ existentes no leite maduro (CALIL; FALCÃO, 2003).

Do ponto de vista químico, o leite humano apresenta em sua composição nutricional todos os constituintes necessários para a alimentação e crescimento do bebê. Contém água em quantidade suficiente, assim como macronutrientes (carboidrato, proteínas e gordura) e micronutrientes (vitaminas e minerais). É também considerado como uma ótima fonte de cálcio, fornece quantidades moderadas dos elementos zinco e ferro, além de baixos teores de magnésio e traços de manganês e cobre (LUO, *et al.*, 2010).

2.1 - Composição do leite humano em comparação ao leite de vaca

A Tabela 1 mostra uma comparação da composição do leite materno em relação ao leite de vaca.

Tabela 1- Teores médios de macronutrientes no leite humano maduro e leite de vaca

Componente	Leite humano maduro (acima de 14 dias)	Leite de vaca
Proteína (g·100g⁻¹)	1,0	3,4
Caseína (g·100g⁻¹)	0,4 (40% da proteína)	2,8 (80% da proteína)
Gordura (g·100g⁻¹)	3,8	3,7
Lactose (g·100g⁻¹)	7,0	4,6
Minerais (g·100g⁻¹)	0,2	0,8
Energia (kcal·100g⁻¹)	66	65

Fonte: Adaptado de SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA (2012)

De acordo com a Sociedade Brasileira de Pediatria (2012), na impossibilidade da amamentação, as Fórmulas de Alimentação Infantil mostram-se como o substituto mais indicado, e em contrapartida, o leite de vaca não é um alimento recomendado para crianças menores de dois anos.

Nota-se que as maiores diferenças se relacionam ao teor proteico, que se mostra mais elevado no leite de vaca, devido ao maior teor de caseína, e em contrapartida, menor teor de lactose, em relação ao leite materno. Segundo Walstra, Wouters e Geurts (2006), os componentes também variam fortemente durante todo o período de lactação (Tabela 2).

Tabela 2- Composição média do leite humano e do leite de vaca

Componente	Unidade (por 100g)	Colostro humano	Leite humano maduro	Leite de vaca
Valor Energético	kJ	240	300	290
Lipídios	g	2,5	4,2	4
Ácido Linoleico	mg		400	70
Colesterol	mg	25	20	13
Lactose	g	5	6,3	4,6
Outros sacárides	g	1,8	1,3	0,1
Proteínas	g	1,6	0,8	3,3
Compostos não proteicos	g	0,5	0,5	0,1
Cálcio	mg	30	35	115
Magnésio	mg	3,5	3	11
Zinco	mg	1	0,3	0,4
Ferro	µg	75	80	20
Fósforo	mg	14	14	95
Cobre	µg	60	40	2
Vitamina A	µg	200	80	45
Vitamina D	µg		0,01	0,06
Vitamina E	µg	1	0,4	0,1
Tiamina (B1)	µg	2	17	45
Riboflavina (B2)	µg	30	30	180
Vitamina B6	µg		6	65
Ácido Fólico	µg		5	5
Vitamina B12	µg		0,01	0,4
Vitamina C	mg	4	4	2,2

Fonte: Adaptado de Walstra; Wouters; Geurts (2006)

a) Composição Lipídica

As gorduras constituem a maior fonte de energia do leite humano, aproximadamente 45% a 55% do valor calórico total (CALIL; FALCÃO, 2003). O teor médio de lipídios se assemelha ao leite bovino, porém os resíduos de ácidos graxos dos triacilgliceróis apresentam um padrão diferente, uma vez que ácidos de cadeia curta (menos de 12 átomos de carbonos) são pouco presentes, e contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (*PUFA*), os quais representam cerca de 88% de gordura do leite (18-22 átomos de carbono, 2-5 ligações duplas) (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Segundo Calil e Falcão (2003) , assim como no leite bovino, a maior proporção da gordura láctea é formada a partir dos lipídeos circulantes, derivados da dieta e/ou dos depósitos maternos. Assim, uma dieta pobre em gorduras e com elevado teor de carboidratos pode promover alterações na proporção dos ácidos graxos de cadeia média e intermediária.

Os lipídios do leite humano são facilmente digeríveis e absorvíveis em decorrência da ação combinada de vários fatores, como a organização do glóbulo de gordura, a composição, tamanho e distribuição de ácidos graxos na molécula do triacilglicerol e as atividades enzimáticas complementares. O leite humano é fonte ainda dos ácidos linoléico (C18:2, ω -6, 8-17%) e linolênico (C18:2, ω -3, 0,5%), considerados essenciais, que são precursores dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa – Ácidos Docohexaenoico (DHA, 22:6n-3) e Ácido Araquidônico (ARA, 20:4n-6). Estes são componentes dos fosfolípidos das membranas celulares e exercem importante papel no crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso (CALIL; FALCÃO, 2003; BATISTON, 2013).

b) Composição de Carboidratos

O leite humano contém uma quantidade relativamente elevada de lactose, que constitui cerca de 70% do seu conteúdo de carboidratos, fornecendo de 40% a 50% do conteúdo energético total. Os outros carboidratos, presentes em concentrações muito inferiores são representados pela glicose, galactose, oligossacarídeos complexos e glicoproteínas (CALIL; FALCÃO, 2003).

Por ser um dissacarídeo, a lactose necessita da presença da lactase, enzima que promove sua hidrólise em glicose e galactose. O alto teor de lactose no leite humano é de grande importância para o organismo, pois seu produto metabólico, a galactose, entra na constituição de integrantes do Sistema Nervoso Central (FERREIRA, 2005). Além disso, o alto conteúdo deste dissacarídeo acarreta grande acúmulo de água -livre, ou seja, que não precisa ser obrigatoriamente excretada com sais pelos rins, atuando assim, como uma reserva para a termorregulação, por meio da sudorese (CALIL; FALCÃO, 2003).

Os lactentes têm capacidade de absorver mais de 90% do conteúdo de lactose do leite humano. Segundo Calil e Falcão (2003), a permanência de pequena quantidade de carboidrato na luz intestinal é considerada como um efeito fisiológico normal, que traz benefícios à criança, como: I) fezes mais amolecidas, evitando constipação; II) crescimento adequado da microbiota local, promovendo queda do pH e tornando o ambiente impróprio ao crescimento de bactérias patogênicas; III) absorção facilitada de cálcio e fósforo na luz intestinal, o que pode auxiliar na prevenção da doença metabólica óssea.

c) Composição Proteica

O perfil de aminoácidos das proteínas do leite humano é bastante adequado às características metabólicas do lactente, uma vez que fornece, qualitativamente e quantitativamente, todos os aminoácidos essenciais, compatíveis com as necessidades e limitações metabólicas do lactente, fato que não acontece com o leite de vaca. Maiores concentrações de aminoácidos essenciais / indispensáveis de alto valor nutricional (como por exemplo, cistina e taurina) são fundamentais ao desenvolvimento do sistema nervoso central. A glutamina, também um aminoácido condicionalmente essencial, promove o crescimento de epitélio intestinal (SILVA, 2007).

O recém-nascido e o lactente são dotados de uma atividade anabólica intensa, o que leva a uma necessidade de nitrogênio correspondente. Sua necessidade proteica é estimada em cerca de 2,0g a 2,5g por kg/dia, decrescendo gradualmente até chegar a $1,3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ por volta do quarto

mês. O leite humano maduro fornece, em média, 0,9 g de proteína para cada 100 mL (CALIL; FALCÃO, 2003).

Com o decorrer da lactação o teor de caseínas no leite humano sofre uma acentuada elevação, acompanhado de decréscimo de soroproteínas. Assim, a relação caseínas/soroproteínas, inicia com valores de 10:90 no colostro, e ainda no início da lactação modifica-se rapidamente, atingindo valores de 40: 60 ou até de 50:50 na fase do leite maduro, em contraste ao leite de vaca, cuja relação é estimada em 80:20 (SILVA, 2007).

Além das diferenças quantitativas, há diferenças qualitativas, até mesmo entre as frações de caseínas do leite humano e de vaca (Tabela 3). Segundo Silva (2007) no leite humano ocorre predomínio das frações beta (50%) e kappa (20% a 27%), enquanto no leite de vaca as frações α_1 e α_2 , em conjunto, representam mais de 50% das caseínas totais. A fração de kappa-caseína do leite humano contém grande quantidade de carboidratos (galactose, N-acetilglicosamina e N-acetil-galactosamina), importantes para prevenção de infecções intestinais provocadas por microrganismos patogênicos, já que, durante o processo de digestão são liberados glicopeptídeos responsáveis pelo crescimento de bifidobactérias, exercendo efeito protetor à mucosa intestinal. Além disso, os fragmentos de beta-caseína (fosfopeptídeos) oriundos a partir de proteólises têm sido apontados por afetar a solubilidade e, conseqüentemente, a absorção de cálcio e zinco no lúmen intestinal.

Tabela 3 – Composição protéica média do leite humano e de vaca

Proteína	Colostro humano (g·kg⁻¹)	Leite humano maduro (g·kg⁻¹)	Leite de vaca (g·kg⁻¹)
Caseína	5	2,5	26
α- La	3	2	1,2
β- La	0	0	3,2
Soroalbumina	0,4	0,3	0,4
Imunoglobulinas	2,5	0,8	0,7
Lactoferrina	3,5	1,5	< 0,1
Lisozima	0,5	0,5	0,0001

Fonte: Adaptado de Walstra; Wouters; Geurts (2006)

O leite humano apresenta teor de proteínas, em média, três vezes menor em relação ao leite de vaca, e maior concentração de soroproteínas em relação às caseínas. A caseína encontra-se no leite humano em menor concentração e com uma estrutura molecular diferenciada, e por isso coagula em pequenos flocos macios e porosos, facilitando a ação enzimática. Assim, é considerada de fácil digestão e absorção, o que reduz o tempo de esvaziamento gástrico e impede a aderência de bactérias patogênicas à mucosa intestinal (CALIL; FALCÃO, 2003).

Outro facilitador é que como o leite humano é constituído basicamente de proteínas do tipo globulina, não necessita de fermentação intensa para ser digerido e conseqüentemente produz menos gases, evitando as cólicas nos bebês. Em contrapartida, as caseínas do leite de vaca são altamente fosforiladas, formando coágulos firmes e mais resistentes, até mesmo à digestão (SILVA *et al.*, 2007).

Assim, ao alimentar um bebê com leite de vaca, os seus rins têm dificuldade em processar a grande quantidade de produtos de degradação, especialmente em combinação com os minerais que vão juntamente com as caseínas. Um longo tempo decorre até que o coágulo esteja suficientemente digerido para prosseguir para o intestino delgado, e portanto, ao fazer fórmulas infantis a partir de leite de vaca, a composição de proteína precisa sofrer ajuste considerável (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Segundo Cyrillo *et al.* (2009), as soroproteínas constituem no leite humano, cerca de 60 a 90% de seu teor protéico total, com predomínio da alfa-lactalbumina (80%), incluindo ainda na sua composição a lactoferrina, a lisozima, a soroalbumina e as imunoglobulinas. O leite materno contém ainda uma grande variedade de proteínas bioativas que estão envolvidas na defesa contra infecções, função imunológica e desenvolvimento. (LÖNNERDAL, 2014)

A alfa-lactalbumina (α -LA) constitui cerca de 40% das soroproteínas no leite humano, é essencial ao transporte de ferro bem como ao sistema enzimático na síntese de lactose na glândula mamária. A α -La bovina e humana apresentam um grau razoável de similaridade em relação à sequência e composição de aminoácidos, e o que indica uma bioatividade similar. Assim como outros componentes, esta tem demonstrado possuir atividade prebiótica, estimulando o crescimento de bifidobactérias (LÖNNERDAL, 2016)

Nota-se que no leite de vaca a beta-lactoglobulina (β -LG) é uma fração importante das soroproteínas, enquanto no leite humano ela está ausente. Assim, devido a sua alta resistência à hidrólise intestinal e pelo fato de não ser encontrada no leite materno, esta proteína constitui uma importante fração antigênica do leite de vaca, e por isso vem sendo apontada como a principal responsável por reações alérgicas em lactentes (DRUNKLER; FARINA; NETO, 2010).

Os maiores teores das imunoglobulinas são encontrados no colostro, e, nessa fase da lactação, são elementos importantes na proteção do recém nato contra microrganismos presentes no canal de parto (CALIL; FALCÃO, 2003). Além disso, conferem proteção, particularmente, ao trato gastrointestinal e respiratório, sendo a principal a Imunoglobulina Secretória (SIgA), que corresponde a 90%, embora outras, como IgG, IgM, IgD e IgE, também estejam presentes. A IgA é resistente à digestão, podendo, atravessar intacta o trato gastrointestinal e alojar-se a superfície das células epiteliais intestinais. Desse modo, pode formar um revestimento protetor, impedindo, a aderência de substâncias alergênicas e de bactérias e vírus patogênicos, bem como de suas toxinas (SILVA, 2007).

A lactoferrina é uma glicoproteína presente em concentrações elevadas no leite humano, cerca de 15% a 20% do total protéico, sob forma amplamente insaturada. Segundo Lönnerdal (2014), é conhecida por ser multifuncional, uma vez que tem propriedades antibacteriana, antivirais, imunológicas e antiinflamatórias, devido a sua notável resistência às enzimas proteolíticas. Apresenta dois sítios capazes de se ligar a íons Fe^{+3} , impedindo microrganismos patogênicos de utilizar esse mineral para seu metabolismo (CALIL; FALCÃO, 2003).

Outro composto importante presente no leite humano é a mucina, uma proteína altamente glicosilada que está ligada aos glóbulos de gordura, cuja principal função é inibir a adesão bacteriana (SILVA, 2007).

A osteopontina também é uma proteína do leite materno, descrita primeiramente nos ossos. É glicosilada e fosforilada, além de ser multifuncional, por estar envolvida na ativação imune, cicatrização, angiogênese e remodelação óssea. É também encontrada no leite bovino, porém em concentração muito menor (LÖNNERDAL, 2016)

d) Composição Mineral

Segundo Calil e Falcão (2003) os macrominerais do leite humano incluem sódio, potássio, cloreto, cálcio, magnésio, fósforo e sulfato, que variam principalmente devido ao estágio de lactação. Enquanto os conteúdos de sódio e cloreto diminuem com o passar dos meses, os de potássio, cálcio, fósforo e magnésio se elevam.

O conteúdo de minerais no leite humano (cerca de 0,2%) é muito menor do que no leite de vaca (0,6% a 0,7%), o que está em acordo com o baixo teor de proteínas e alto teor de lactose. O conteúdo de alguns oligoelementos, como ferro e cobre, é relativamente elevado, enquanto o teor de fosfato de cálcio é mais baixo em comparação ao leite bovino, já que a taxa de crescimento relativa de um bebê é muito mais lenta que a de um bezerro (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

e) Composição Vitamínica

Segundo Calil e Falcão (2003) o conteúdo vitamínico do leite humano é afetado por vários fatores, sendo o estado nutricional materno o mais importante. Quando a oferta de vitaminas é baixa, seus níveis lácteos são também baixos, necessitando de suplementação. Em condições normais, o leite humano é suficiente para suprir as necessidades do lactente, desde que sejam ingeridos 750 mL a 1000 mL por dia.

2.2 Fórmulas Infantis para lactentes

2.2.1 Histórico do uso de substitutos do leite materno

Segundo Rea (1990) até o final da era pré-industrial, a alimentação do lactente era realizada exclusivamente com leite materno e, na impossibilidade de a criança ser amamentada pela própria mãe, isso geralmente era feito pela -ama de leite ou avó.

O primeiro registro encontrado da substituição do leite humano na alimentação infantil é de 1784, quando um médico inglês indicou o leite de vaca

como alternativa alimentar. A descoberta, em 1838 na Alemanha, de que o leite de vaca tem mais proteína do que o leite materno pode ser considerado o marco referencial para o discurso a favor do uso deste substituto. Outras descobertas importantes, ainda no final do século XX, na história da alimentação artificial infantil foram a evaporação do leite de cabra, em 1883, e o conhecimento da composição do leite humano, nos EUA, em 1885 (CAMPOS *et al.*, 2008)

Em 1898 se notam registros de múltiplas patentes de alimentos infantis, o que impulsionaram inúmeras discussões entre os cientistas da época sobre como compor ou "formular" leites, ou seja, como adequá-los para consumo infantil. Daí o início e persistência do uso da palavra fórmula ("infant formula") para estes alimentos (REA, 1990).

Em 1915 foi introduzida nos EUA o "*Synthetic Milk Adapted*" — SMA pelo o laboratório "*Wyeth*" (subsidiária do "*American Home Products*"), que foi acompanhado pelo laboratório "*Ross*" (hoje "*Abbott*") lançando o "*Similac*", em 1925, fórmulas preparadas especialmente para uso infantil. Logo depois, em 1929 o laboratório "*Mead-Johnson*" entra no mercado americano com a primeira fórmula à base de soja produzida comercialmente — o "*Sobeel*" e firma-se no mercado com diversas fórmulas entre as quais o "*Enfamil*" (REA, 1990).

Enquanto essa expansão de Fórmulas Infantis se dava nos EUA nas primeiras décadas do século XXI, basicamente por meio das três companhias acima mencionadas, na Europa, grandes excedentes de produção de leite levaram à industrialização e exportação destes produtos por companhias da Suíça (*Nestlé*), da Alemanha (*Carnation*), da Inglaterra (*Glaxo e Cowand Gate*) (REA, 1990).

No fim da década de 70, o Brasil já era considerado um mercado promissor, principalmente devido ao crescimento demográfico e melhora nas condições de vida da população. Na década de 1980, as quatro companhias mais importantes de fórmulas infantis que dominavam o mercado mundial eram a *Nestlé* (31%), a *Abbot* (15%), a *Bristol - Myers - Mead-Johnson* (11%) e a *Wyeth - American Home Products* (11%), sendo que no Brasil a *Nestlé* dominava 95% do mercado (REA, 1990).

Vários avanços foram alcançados com fórmulas mais sofisticadas e adequadas a necessidades específicas. Fórmulas acidificadas, semidesnatadas, adicionadas de ferro, sem lactose, entre outras, constituem parte dos substitutos do leite materno que foram inseridos livremente à disposição das mães. Aliada ao uso da mídia, houve um aumento progressivo na utilização destes produtos, o que desencadeou uma reação mundial com o intuito de obter uma normatização para controle e marketing dos mesmos (CAMPOS *et al.*, 2008).

2.2.2 Definições e composição segundo a Legislação Brasileira

As fórmulas infantis são atualmente regulamentadas pelas seguintes Resoluções, todas publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): I) Resolução RDC nº 43/2011 - Regulamento Técnico para Fórmulas Infantis para Lactentes; II) Resolução RDC nº 44/2011 - Regulamento Técnico para Fórmulas Infantis de Seguimento para Lactentes e Crianças de Primeira Infância; III) RDC nº 45, de 19 de setembro de 2011- Regulamento Técnico para fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância, destinadas a necessidades dietoterápicas específicas.

De acordo com o inciso I do artigo 6º da Resolução RDC nº 43/2011:

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

Já no inciso II do artigo 6º: -Lactente é a criança de zero a doze meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias)II. Encontram-se também outras especificações importantes, como no Art. 8º: -Se o leite de vaca for a única fonte de proteína, o produto pode ser designado como —Fórmula infantil para lactentes à base de leite de vacaII, e no Art. 9º —Se a soja for a única fonte de proteína, o produto pode ser designado como —Fórmula infantil para lactentes à base de sojaII.II(BRASIL, 2011a)

De acordo com o inciso I do artigo 6º da Resolução RDC nº 44/2011:

Fórmula infantil de Seguimento para lactentes e crianças de primeira infância é o produto, em forma líquida ou em pó, utilizado quando indicado, para lactentes sadios a partir do sexto mês de vida até doze meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias) e para crianças de primeira infância sadias (crianças de doze meses até três anos de idade, ou seja, até os 36 meses), constituindo-se o principal elemento líquido de uma dieta progressivamente diversificada.

A alegação –à base de leite de vaca ou –à base de soja também se aplicam às Fórmulas infantis de Seguimento para lactentes e crianças de primeira infância, conforme Art 8º e 9º da Resolução RDC nº 44/2011, respectivamente.

Com relação à composição essencial, ambos os tipos de fórmulas são produtos à base de leite de vaca ou de outros animais ou de uma mistura destes, adicionados de ingredientes comprovadamente adequados para alimentação ao público a que se destina. Outra especificação importante é a isenção obrigatória de glúten em todos os aditivos alimentares (BRASIL, 2011a, b)

Segundo a RDC nº 43/2011 e a RDC nº 44/2011 da ANVISA (BRASIL, 2011a,b), a composição das Fórmulas Infantis que não tem indicação dietoterápica específica e deve seguir uma série de requisitos, cujo resumo é mostrado a seguir (Tabela 4):

Tabela 4- Composição das Fórmulas Infantis segundo a Legislação vigente

	Fórmulas Infantis para Lactentes	Fórmulas Infantis de Seguimento	Observações
Valor energético	mínimo 60 kcal (250 kJ) máximo 70 kcal (295 kJ) (em 100mL do produto pronto para consumo)		Em 100 kJ devem conter as quantidades adequadas de nutrientes para o público a que se destina
Composição Lipídica (g·100kcal⁻¹)	4,4 a 6,0	4,0 a 6,0	Gorduras e óleos hidrogenados não podem ser utilizados; Ácido linoléico: 0,07 a 0,33 Ác. alfa-linolênico: mín. 0,012
Composição Proteica (g·100kcal⁻¹)	1,8 a 3,0 (proteína láctea) 2,25 a 3,0 (proteína de soja ou mistura)	1,8 a 3,5 (proteína láctea) 2,25 a 3,5 (proteína de soja ou mistura)	Devem conter quantidade disponível de cada aminoácido essencial e semi-essencial no mínimo igual ao contido na proteína de referência (leite humano)
Composição Carboidratos (g·100kcal⁻¹)	9,0 a 14,0 (Não é permitido frutose e mel)	9,0 a 14,0 (É permitido frutose e mel)	Somente lactose, maltose, sacarose, glicose e xaropes, maltodextrina e amido estão permitidos
Outros Constituintes	O conteúdo de vitaminas, minerais e outras substâncias deve atender ao disposto na Resolução específica; É permitido o uso de outros ingredientes opcionais para adequar a formulação ao esquema alimentar apropriado		

Fonte: Adaptado de Brasil (2011a,b)

2.2.3 Composição das Fórmulas Infantis

A Tabela 5 ilustra uma comparação entre a composição do leite materno, o leite de vaca e as fórmulas infantis. É possível notar que tais fórmulas têm maior semelhança com o leite materno em relação ao leite de vaca, e por isso, se configuram como uma melhor opção ao lactente, quando a amamentação não é indicada.

Tabela 5- Nutrientes do leite humano, leite de vaca e fórmulas infantis

	Leite humano	Leite de vaca integral	Fórmulas infantis
Proteínas	Quantidade adequada, fácil digestão	Quantidade aumentada; Difícil digestão devido a relação Caseína/ Proteínas do soro	- Melhor relação Caseínas/ Proteínas do soro; - Melhor perfil de aminoácidos; - Algumas fórmulas possuem redução protéica
Lipídeos	Suficiente em ácidos graxos essenciais; Lipase para digestão	Deficiente em ácidos graxos essenciais; não apresenta Lipase	- Adicionados ácidos graxos essenciais (ω -3, ω -6); - Diminuição da gordura saturada e acréscimo de óleos vegetais
Minerais	Quantidade Correta	Pouca quantidade; mal absorvido	- Modificação nos teores; - Relação cálcio/fósforo adequada, favorecendo mineralização óssea
Ferro e Zinco	Pouca Quantidade, Bem absorvido	Pouca quantidade; mal absorvido	Adicionado
Vitaminas	Suficiente	Deficiente C, D e E	Vitaminas adicionadas
Prebióticos	Suficiente	Deficiente	Adicionado (FOS,GOS)*
Probióticos	Suficiente	Deficiente	Adicionado
Água	Suficiente	Necessário extra	Pode ser necessária

*FOS- Frutoligossacarídeos; GOS- Galactoligossacarídeos

Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA (2012)

A Tabela 6 ilustra as recomendações da Sociedade Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (ESPGHAN), para os micronutrientes de Fórmula Infantil, e faz uma comparação com as especificações da legislação brasileira para estes produtos.

Tabela 6- Recomendações para micronutrientes das Fórmulas Infantis pela ESPGHAN e Legislação Brasileira

Componente	Recomendados pela ESPGHAN		Recomendados pela RDC 43/2011	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Valor Energético (kcal·100mL⁻¹)	60	70	60	70
Proteínas (g·100kcal⁻¹)	1,8	3,0	1,8	4,0
Lipídios (g·100kcal⁻¹)				
Gorduras totais	4,4	6,0	4,4	6,0
Ácido Linoleico	0,3	1,2	0,3	-
Carboidratos (g·100kcal⁻¹)	9,0	14,0	9,0	14
Vitaminas Lipossolúveis (µg·100kcal⁻¹)				
Vitamina A	60	180	60	180
Vitamina D	1	2,5	1	2,5
Vitamina E	0,5	5	0,5	-
Vitamina K	4	25	4	-
Vitaminas Hidrossolúveis (µg·100kcal⁻¹)				
Tiamina (B1)	60	300	60	-
Riboflavina (B2)	80	400	80	-
Niacina	300	1500	300	-
Vitamina (B6)	35	175	35	-
Vitamina B12	0,1	0,5	0,1	-
Ácido Pantotênico	400	2000	400	-
Ácido Fólico	10	50	10	-
Vitamina C	8	30	10	-
Biotina	1,5	7,5	1,5	-
Minerais e elementos traços (mg·100kcal⁻¹)				
Cálcio	50	140	50	-
Ferro	0,50	20	0,45	-
Fósforo	25	90	25	-
Magnésio	20	60	5	-
Sódio	50	160	20	60
Cloro	60	160	50	160

Fonte: Adaptado de Owens; Labuschagne; Lombard (2017); Brasil (2011)

Vê-se grande similaridade entre os dois documentos, o que indica uma certa padronização entre produtos nacionais e internacionais, porém, não existe um padrão de formulação. Cada fabricante pode adaptar, por exemplo, as concentrações, instruções de preparo e tamanho, bem como a indicação de uso, o que torna necessário um acompanhamento da utilização destes produtos por um profissional de saúde (CORKINS; SHURLEY, 2016).

Segundo Walstra; Wouters; Geurts (2006) geralmente nas formulações para bebês de até seis meses de idade são utilizados leite desnatado e soro de leite doce, por exemplo, na proporção 1:5, sendo que o soro deve ser em parte dessalinizado, conter somente vestígios de ácido láctico e ausência de nitrato. O teor de carboidratos pode ser aumentado por adição de lactose ou um permeado de ultrafiltração, sendo ocasionalmente adicionados oligossacarídeos (ou lactulose). A gordura é geralmente uma mistura de óleos vegetais, contendo ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis em quantidades adequadas. A vitamina C geralmente é adicionada, e se necessário, vitaminas A, D e E. A fortificação com ferro e cobre é uma prática comum.

No caso de bebês com mais de 6 meses de idade, a composição da mistura é diferente, geralmente aumentando-se a proporção de leite desnatado. Outros produtos são necessários para crianças nascidas prematuras, ou para crianças que sofrem de alergia ou alguma doença metabólica (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

O processo de fabricação das fórmulas infantis envolve geralmente mistura úmida dos ingredientes e pré-emulsificação, seguida por pasteurização e homogeneização. Depois da pasteurização, pode-se preparar um produto líquido ou seco. No primeiro caso, o leite passa por processamento UHT, seguido de embalagens assépticas. Ao preparar fórmulas em pó, o leite é concentrado por evaporação, seguido de secagem por aspersão (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

2.2.4 Variações das fórmulas infantis de acordo com dietas específicas

As recomendações apontam que, na impossibilidade do aleitamento materno as crianças deveriam receber fórmulas infantis, porém não é o que se observa, já que estudos mostram que no Brasil, o leite de vaca é frequentemente utilizado como o principal substituto do leite materno (BORTOLINI *et al.*, 2013). Além de ter composição mais aproximada em relação ao leite materno, as fórmulas infantis para lactentes têm como vantagens a possibilidade de atender crianças com necessidades especiais, como, por exemplo, crianças com baixo peso ao nascer, com alergias às proteínas do leite ou com desordens metabólicas.

A resolução RDC nº 45/2011 traz a definição para fórmula infantil destinada a necessidades dietoterápicas específicas. É um produto cuja composição foi alterada ou especialmente formulada para atender, por si só, às necessidades específicas decorrentes de alterações fisiológicas, doenças e/ou para a redução de risco de alergias em indivíduos predispostos, tanto lactentes como crianças de primeira infância de lactentes. De acordo com a resolução, o produto não pode trazer a indicação de condição de saúde para a qual possa ser destinada, conforme disposto na Lei n. 11.265 de 2006, que regulamenta a comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância (BRASIL, 2011c).

A segurança e a eficácia a que a fórmula se propõe devem ser comprovadas cientificamente. As vitaminas, minerais ou ingredientes opcionais adicionados às formulações devem ser utilizados com base nas listas de referência dispostas na RDC 43/2011 e 44/2011. Também é exigido adicionalmente que a quantidade dos nutrientes relacionados à necessidade dietoterápica específica seja declarada na tabela de informação nutricional (BRASIL, 2011c).

Novas fórmulas são desenvolvidas quando grupos de crianças com necessidades nutricionais são identificados (CAMPOS *et al.*, 2008). Como exemplo, pode-se citar fórmulas com redução ou hidrólise total da lactose, para atender à lactentes intolerantes a este carboidrato, bem como aquelas que utilizam proteínas hidrolisadas ou contendo proteína de soja em substituição às proteínas lácteas, como alternativa aos alérgicos.

O diagnóstico destas duas reações adversas ao consumo de leite e derivados deve ser realizado de forma criteriosa, já que seu tratamento se baseia, em alguns casos, na utilização de produtos especiais e dispendiosos, buscando melhorar a qualidade de vida dos lactentes (LÖNNERDAL, 2016).

a) Fórmulas para intolerantes à lactose

A intolerância alimentar é um fenômeno adverso associado a mecanismos não imunológicos. Segundo Fox (2007) em relação à intolerância ao leite de vaca, muitas pessoas perdem totalmente ou parcialmente, de forma gradual, a capacidade de produzir a enzima lactase, responsável pela digestão da lactose, carboidrato predominante no leite. A lactose realiza importantes funções biológicas, que incluem favorecer a absorção de cálcio, estimular o crescimento de bifidobactérias e fornecer galactose, um nutriente essencial para a formação de galactolipídios cerebrais (MALDONATO *et al.*, 1998).

Segundo Maldonato *et al.* (1998) é comum encontrar intolerância à lactose como uma característica secundária de doenças gastrointestinais, como consequência da inflamação ou destruição de vilosidades intestinais, ou devido à deficiência congênita de lactase. Para a maioria da população humana, em especial os asiáticos e os negros, a expressão genética desta enzima reduz naturalmente após a infância, para 5% a 10% da concentração inicialmente produzida.

Quando ocorre a falta da enzima lactase, a lactose não é convertida em glicose e galactose e chega em sua forma nativa ao intestino, onde é fermentada pelos microrganismos presentes. Essa fermentação gera gases que criam uma sensação de desconforto por distensão abdominal e flatulência. Também são produzidos ácidos que, junto com a lactose não digerida, favorecem a passagem de água para o intestino, resultando em diarreia. Os sintomas variam de indivíduo para indivíduo, dependendo da dose ingerida, do grau de deficiência e da forma do alimento consumido (RENHE, 2014).

Segundo Mattar e Mazo (2010) a intolerância congênita é uma condição extremamente grave, e caso não seja diagnosticada precocemente pode levar ao óbito. O recém-nascido apresenta diarreia líquida ao ser amamentado ou receber fórmulas contendo lactose, sendo que, lançando mão de uma dieta

restritiva os sintomas desaparecem e esses recém-nascidos têm crescimento normal.

A exclusão total e definitiva de produtos lácteos da dieta deve ser evitada, pois pode acarretar prejuízo nutricional de cálcio, fósforo e vitaminas, e acarretar na diminuição da densidade mineral óssea e ocorrência de fraturas (RENHE, 2014). Em uma pequena porcentagem de casos, devido a intolerâncias alimentares, crianças precisam de fórmulas especializadas, e por isso, esta intervenção deve ser recomendação de um nutricionista ou médico (MALDONATO *et al.*, 1998)

Em alternativa a isso, é recomendado o uso de fórmulas infantis com baixo teor ou até mesmo isentos de lactose, que podem ser uma opção interessante, principalmente para encurtar o curso da diarreia, porém não é indicada a menos que haja risco de desnutrição (CORKINS; SHURLEY, 2016). De acordo com a RDC 45/2011 da ANVISA, fórmulas com restrição de lactose são aquelas que contenham um teor de lactose inferior ou igual a $10 \text{ mg} \cdot 100\text{kcal}^{-1}$ ($2,5 \text{ mg} \cdot 100\text{kJ}^{-1}$) (BRASIL, 2011c).

b) Fórmulas para alérgicos às proteínas lácteas

Além da intolerância, outra reação adversa que vem se tornando cada vez mais comum é a alergia ao leite. Estimativas internacionais indicam que em crianças 80% dos casos de anafilaxia são causadas por alimentos, e o leite enquadra-se entre os oito alergênicos de maior relevância no mundo, de acordo com o *Codex Alimentarius* (ANVISA, 2015)

Segundo a Cartilha de Alergia Alimentar (PROTESTE, 2004), a alergia alimentar possui maior severidade nos sintomas, já que ocorre em razão de uma resposta exagerada do sistema imunológico relacionada ao consumo de determinado(s) alimento(s).

As reações são muito variadas, com sintomas que podem surgir na pele (urticária, inchaço, coceira, eczema), no sistema gastrointestinal (diarreia, dor abdominal, refluxo, vômito) e respiratório (rinoconjuntivite, tosse, rouquidão, chiado no peito), podendo, em alguns casos, haver o comprometimento de vários órgãos (reação anafilática). Nos casos mais graves, os sintomas aparecem pouco tempo após o contato com o alimento alérgeno; em outros, podem levar até dias para surgir.

Devido à variabilidade da resposta do sistema imunológico humano, não existe uma estrutura em particular que possam ser diretamente responsabilizada pela alergenicidade do leite. Embora os principais compostos alergênicos são encontrados nas frações caseína, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, todas as proteínas do leite são potencialmente alérgenos, inclusive aquelas presentes em pequenas concentrações no produto (DRUNKLER; FARINA; NETO, 2010). Assim, é importante que o alimento destinado aos alérgicos seja realmente isentos de quaisquer traços de leite, de forma a garantir a segurança dos lactentes.

A alergia a proteína do leite de vaca (APLV) ocorre principalmente nos três primeiros anos de vida, sendo que em países desenvolvidos, afeta entre 2% e 7,5% das crianças, especialmente nos primeiros meses de vida. O diagnóstico da APLV deve ser realizado de forma criteriosa, já que seu tratamento se baseia na exclusão completa de leite de vaca e derivados da dieta. Assim, é importante a introdução de uma dieta de substituição adequada, que atenda as necessidades nutricionais das crianças e permita seu crescimento e desenvolvimento normal (PEREIRA; SILVA, 2008).

Ao iniciar a dieta de exclusão, é recomendada a continuidade do aleitamento com retirada das proteínas do leite de vaca da dieta materna. Porém há casos onde há a impossibilidade de manutenção do leite materno, e assim as opções mais recomendadas são fórmulas específicas em substituição ao leite de vaca, como fórmulas a base de hidrolisados, a base de aminoácidos ou a base de soja.

Segundo Maldonato *et al.* (1998) não há consenso sobre a adequação das fórmulas de soja para o tratamento e a prevenção de alergias nutricionais e a opinião atual parece favorecer fórmulas proteicas hidrolisadas. Assim, fórmulas contendo proteínas do leite de vaca hidrolisadas parcial ou extensamente mostraram-se menos propensas a ocorrência de sintomas de reações alérgicas em alguns casos, sendo consideradas hipoalergênicas conforme o FDA (do inglês *Food and Drug Administration*). Estas proteínas passam por processos químicos ou enzimáticos de hidrólise com o objetivo de redução do peso molecular, resultando em peptídeos e aminoácidos, porém não estão sem risco, pois podem conter epítopos residuais capazes de ainda provocar reação alérgica (MALDONATO *et al.*, 1998).

I) Fórmulas com um elevado grau de hidrólise

Nestes produtos, os peptídeos têm normalmente uma massa molecular inferior a $5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, a oferta de carboidratos normalmente é sob a forma de maltodextrina e de lipídios como triacilglicerois de cadeia média, juntamente com ácidos graxos essenciais. A fonte protéica pode ser derivada de caseínas, proteína de soro de leite de bovino ou uma mistura destas, bem como uma mistura de proteínas de soja e colágeno (MALDONATO *et al.*, 1998).

II) Fórmulas parcialmente hidrolisadas

É apenas ligeiramente degradada, com peptídeos entre $8000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $20000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, sendo o restante dos constituintes semelhantes aos das fórmulas padrão. Teoricamente, estas fórmulas suprimiriam efetivamente a reação de hipersensibilidade, induzindo a uma tolerância secundária (MALDONATO *et al.*, 1998).

III) Fórmulas à base de proteína de soja

De acordo com a RDC 45/2011 da ANVISA, fórmulas à base de soja são aquelas que contenham a soja com a única fonte de proteína. (BRASIL, 2011c).

Segundo Corkins; Shurley (2016) estas são livres de proteínas lácteas, uma vez que tem base vegetal, e por isso necessitam ser suplementadas com metionina, carnitina, cobre, zinco, ferro e cálcio, por exemplo, para que atenda aos requisitos para o crescimento infantil. As fontes de carboidratos variam de acordo com o fabricante, podendo incluir maltodextrina, xarope de milho e/ou sacarose. Já o teor de gordura é derivado de óleo vegetal, acrescido de DHA e ARA.

Estas fórmulas são recomendadas para lactentes com galactosemia e deficiência de lactase hereditária (primária), e contraindicadas no caso de alergia ao leite, pois 10% a 14% dos lactentes com alergia às proteínas do leite de vaca também reagem à proteína de soja (OWENS; LABUSCHAGNE; LOMBARD, 2017)

c) Fórmulas Pré-Termo

Para atender às necessidades específicas de uma doença ou condição médica, principalmente ocasionadas pelo nascimento pré-maturo, estas fórmulas incluem proteína hidrolisada extensivamente, aminoácidos e baixo teor de carboidratos, além de gordura modificada e baixo teor mineral (CORKINS; SHURLEY, 2016). Por terem uma base bem particular, uma fórmula pré-termo apropriada deve ser prescrita por neonatologistas ou pediatras, nos casos em que a amamentação não pode ser praticada (OWENS; LABUSCHAGNE; LOMBARD, 2017).

d) Fórmulas com adição de Probióticos e Prebióticos

Probióticos podem ser descritos como culturas de microrganismos vivos que influenciariam favoravelmente a saúde do hospedeiro, melhorando a sua microflora nativa, especialmente no trato gastrointestinal. Consistem principalmente em espécies de bactérias lácticas e bifidobactérias que são capazes de resistir ao pH baixo do estômago e aos ácidos biliares presentes no intestino. Como efeitos benéficos, pode-se citar a produção de substâncias antimicrobianas, antagonismo contra patógenos e competição por locais de adesão (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). O leite materno contém probióticos que melhoram a imunidade infantil, e para simular este benefício, alguns fabricantes optam por adicioná-los à certas formulações (CORKINS; SHURLEY, 2016)

Segundo Walstra; Wouters; Geurts (2006) os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis, que beneficiam o consumidor por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias no cólon. São substâncias que modificam a composição da microbiota intestinal de tal forma que algumas das bactérias potencialmente promotoras da saúde (especialmente lactobacilos e bifidobactérias) se tornam predominantes.

O leite humano contém oligossacarídeos derivados da lactose, que estimulam a geração de uma microbiota -bifidusl em lactentes alimentados com leite materno. Além disso, estes oligossacarídeos são susceptíveis a um papel na prevenção da infecção durante a amamentação. A lactose e os seus derivados, a lactulose e o lactitol, têm também efeitos prebióticos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

São considerados como principais prebióticos os frutoligossacarídeos (FOS) e galactoligossacarídeos (GOS), sendo estes frequentemente adicionados à fórmulas infantis, com o objetivo de melhorar a imunidade, bem como reduzir o risco de diarreias associadas ao uso de antibióticos. Sua adição é opcional e não deve exceder 0,8g/100mL (OWENS; LABUSCHAGNE; LOMBARD, 2017).

Segundo ROCHA (2008) a composição das fórmulas é um desafio na tentativa de obter o máximo de benefícios possíveis à nutrição do lactente. Para isto necessita-se de nutrientes que atendam as demandas e ao mesmo tempo se adaptem a ser acondicionados na forma desidratada, recuperando a biodisponibilidade e as propriedades requeridas após a solubilização da fórmula na alimentação do lactente.

2.3 Espectroscopia na região do infravermelho

2.3.1 Princípios e definições

A espectroscopia pode ser definida 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. Algumas regiões de interesse para fins analíticos podem ser definidas em função do comprimento de onda (DUFOUR, 2009).

Somando-se a energia eletrônica, a energia vibracional e a energia rotacional de uma molécula, obtém-se sua energia total. É possível separar suas contribuições espectrais, uma vez que estes três tipos de energia são distintos (RODRIGUES, 2012).

Os átomos que compõem uma molécula não formam uma estrutura rígida, e por isso há um movimento constante, mesmo a baixas temperaturas. As energias vibracionais e rotacionais estão relacionadas ao deslocamento dos núcleos atômicos. Devido a maior massa dos núcleos em relação aos elétrons, suas contribuições podem ser separadas, o que é conhecido por aproximação de Born-Oppenheimer. Devido a este fenômeno, os núcleos podem ser considerados como fixos em relação aos elétrons, e na prática o espectro molecular é dividido em três regiões energéticas distintas (Figura 1): a de

microondas e radiofrequências (espectroscopia rotacional); infravermelho (espectroscopia vibracional) e região do visível à ultravioleta (espectroscopia eletrônica) (RODRIGUES, 2012).

Segundo Pavia *et al.* (2010), na região espectral há comprimentos de onda em diferentes unidades, e por isso, devido a ter uma relação diretamente proporcional à quantidade de energia, a unidade mais comumente usada para se referir à radiação infravermelha é o número de onda [cm^{-1}]. Sendo assim, quanto menor o número de onda, menor a energia e vice-versa.

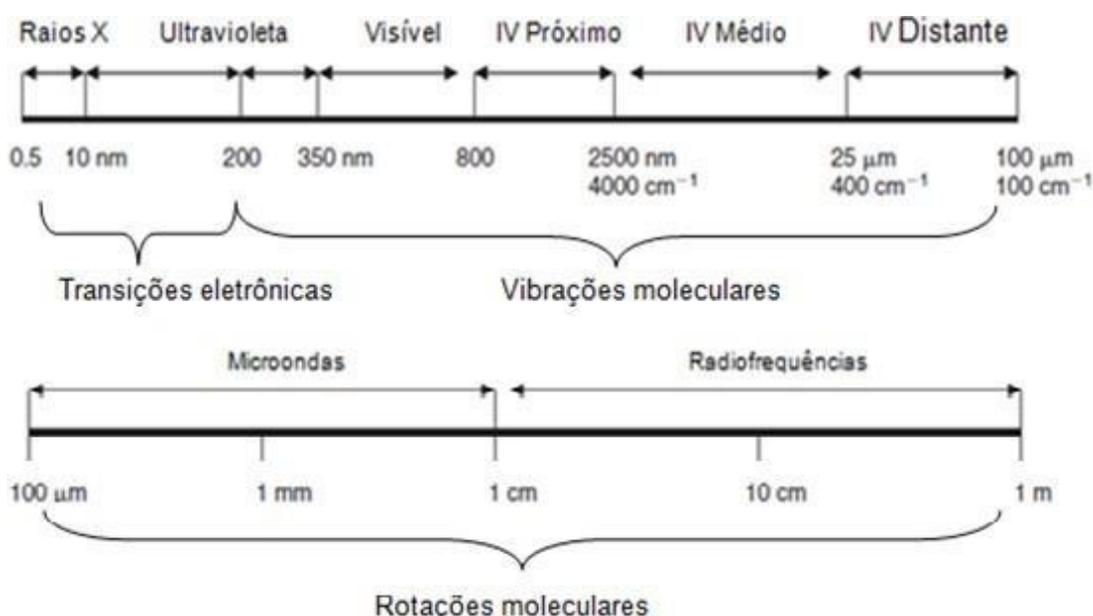


Figura 1– Regiões espectrais de importância analítica

Fonte: Adaptado de DUFOUR (2009); RODRIGUES (2012)

Neste trabalho, a região de interesse é aquela referente ao Infravermelho (IV). Segundo Hooler *et al.* (2009) o espectro IV é usualmente subdividido em três regiões: denominadas IV próximo, IV médio e IV distante, de acordo com os tipos de aplicações e instrumentação. A Tabela 7 fornece os limites aproximados de cada uma das três regiões.

Tabela 7- Regiões espectrais do infravermelho

Região	Comprimentos de onda (λ) (nm)	Números 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 próximo (*near-infrared* - NIR) é a primeira exibindo bandas de absorção relacionadas às vibrações das moléculas. É caracterizada por harmônicos e bandas de combinação e é amplamente utilizada para análises de composição de produtos alimentares. Já 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 8 relaciona as regiões espectrais de interesse analítico na região do IV com as características dos materiais a que se aplicam.

Tabela 8- Regiões espectrais do infravermelho e suas principais aplicações

Região	Números 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 incidência da radiação eletromagnética nas partículas da amostra pode causar diversos tipos de fenômenos, como absorção, transmissão, refração, reflexão e difração da luz incidente (SANTOS *et al.*, 2012).

Segundo Hooler *et al.* (2009) para absorver a radiação IV, uma molécula deve sofrer uma variação no momento de dipolo durante seu movimento rotacional ou vibracional. Não ocorre variação no momento dipolo durante a

vibração ou rotação de espécies homonucleares, tais como O_2 , N_2 ou Cl_2 , e como consequências tais compostos não podem absorver radiação IV.

De acordo com sua natureza, as moléculas podem apresentar diferentes tipos de vibração: modos mais simples, como os de estiramento e dobramento (Figura 2 (a) e (b) , respectivamente), ou outros modos mais complexos, também ativos nesta região (Figura 2 (c) , (d), (e), (f),(g) e (h)).

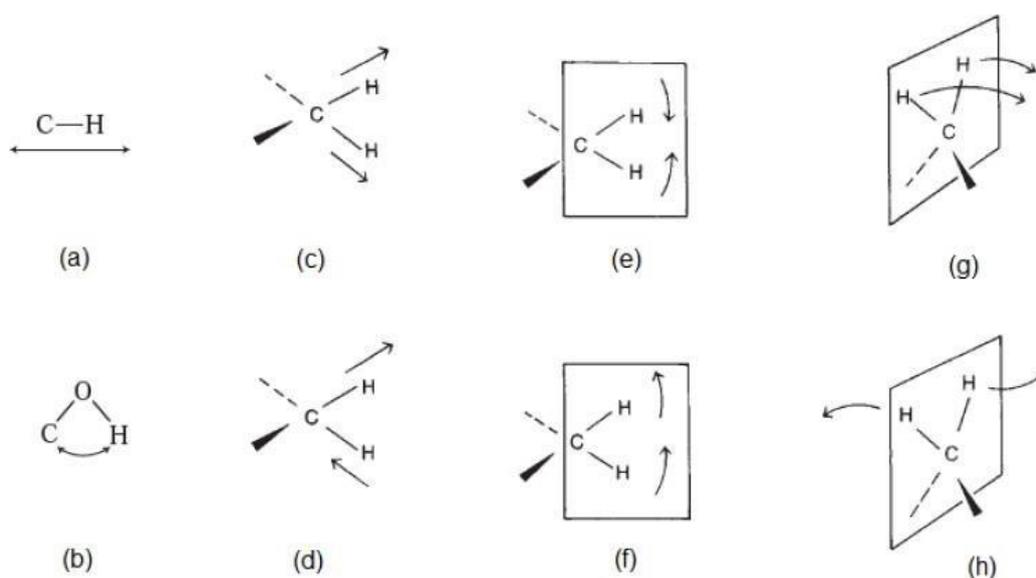


Figura 2 - Representação dos diferentes tipos de vibrações moleculares

(a) Estiramento, (b) Dobramento, (c) Vibração de estiramento simétrico, (d) Vibração de estiramento assimétrico, (e) Vibração de deformação tipo tesoura (*scissoring*), (f) Vibração de deformação tipo oscilação, rotação (*rocking*), (g) Vibração de deformação tipo balanço (*wagging*), (h) Vibração de deformação tipo torção (*twisting*).

Fonte: Pavia *et al.* (2010)

Segundo Dufour (2009), os movimentos vibracionais das moléculas induzem a absorção na região infravermelha, formando bandas de absorção, que ao serem atribuídas à grupos químicos e aliados a análise estatística multivariada, podem ser utilizadas para análises quantitativas e qualitativas, gerando informações específicas sobre o produto investigado.

Quase todos os compostos que tenham ligações covalentes, sejam orgânicos ou inorgânicos, absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho. Os espectros de duas moléculas diferentes jamais serão idênticos, e por isso, este pode servir para moléculas

da mesma forma que impressões digitais servem para seres humanos (PAVIA *et al.*, 2010).

2.3.2 A Espectroscopia na região do Infravermelho Médio, com Transformada de Fourier (FT-MIR)

No ano de 1802 o cientista Thomas Young, em um experimento com luz em fenda dupla, observou o fenômeno de interferência, caracterizado pela sobreposição de ondas em diversos pontos ao longo de sua direção de propagação, gerando regiões onde estas anulam e se amplificam. No fim do século XIX, Albert Abraham Michelson construiu um interferômetro, e sua relação com o espectro foi confirmada em 1892, por Lord Rayleigh, utilizando uma operação matemática denominada transformada de Fourier (FT). (RODRIGUES, 2012).

A aplicação da espectroscopia no infravermelho, como técnica de análise quantitativa, teve um grande crescimento com o advento da transformada de Fourier, usada para o processamento de dados. Nos espectrômetros FT (Figura 3), os dados são obtidos pela divisão da fonte de radiação em dois feixes, com caminhos ópticos que podem ser variados periodicamente para fornecer padrões de interferência (HOOLER *et al.*, 2009).

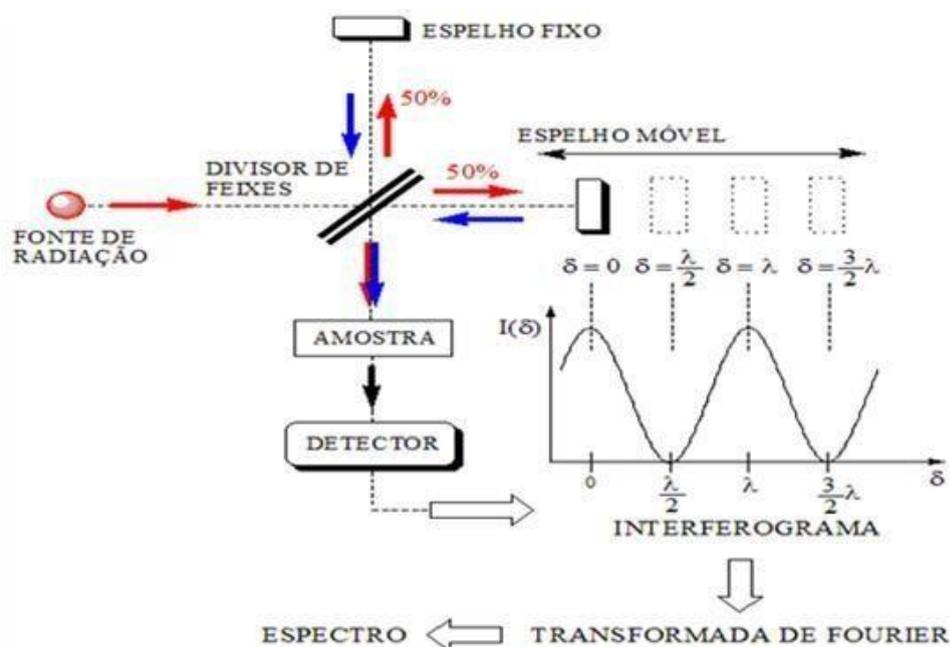


Figura 3- Esquema de Funcionamento da Transformada de Fourier

Fonte: Adaptado de RODRIGUES (2012)

Segundo Mendes (2015) a luz é emitida por uma fonte de luz comum, porém, o feixe é dividido (Figura 3): cerca de metade é refletido 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 metade da intensidade luminosa inicial é refletida pelo espelho móvel (setas azuis). Quando 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 ao posição do espelho móvel, o que é chamado de interferograma. Após isso, o computador converte os dados medidos em um espectro, e então ocorrem duas transformações: uma pelo interferômetro, uma pelo computador (BARTH, 2007).

Espectros da região MIR são comumente utilizados para identificação estrutural de compostos orgânicos, uma vez que as bandas de absorção são causadas pelas vibrações fundamentais de grupos funcionais específicos. Em contrapartida, podem também terem aplicações na análise quantitativa, já que a as intensidades das bandas são proporcionais à concentração de seus respectivos grupos funcionais (RODRIGUEZ-SAONA; ALLENDORF, 2011)

As vantagens deste tipo de equipamento são devido principalmente à maior potência de radiação que atinge o detector, diminuindo assim a intensidade dos ruídos. Além disso, todos os elementos atingem o detector simultaneamente, tornando possível a obtenção de espectros em poucos segundos. Outra vantagem é que os espectros gerados têm maior poder de resolução (discriminação da menor diferença entre dois números de onda) e reprodutibilidade, permitindo análise de dados complexos (HOOLER *et al.*, 2009).

2.3.2.1 Reflectância Total Atenuada (ATR)

Os inúmeros aperfeiçoamentos dos equipamentos espectroscópios, juntamente à necessidade de melhorar o processo de análise de amostras sólidas e líquidas culminaram no desenvolvimento de um acessório que utiliza a Reflectância Total Atenuada (ATR). Nesta técnica, a amostra é posicionada sobre um cristal opticamente denso com alto índice de refração, como por

exemplo o diamante. No caso de amostra sólida, deve-se pressioná-la para proporcionar o máximo de contato (BARTH, 2007).

A radiação infravermelha é produzida e direcionada, a um ângulo específico pelo equipamento, a qual passa através do cristal de diamante em direção a amostra (Figura 4). Parte do feixe de luz penetra uma camada fina da superfície da amostra ($0,5\ \mu\text{m}$ - $5,0\ \mu\text{m}$) (onda evanescente), podendo ser absorvido, enquanto outra parte do feixe de luz é refletido e, em consequência, a radiação que atinge o detector traz informações sobre a radiação IR absorvida pela amostra testada. A intensidade da radiação é atenuada devido as múltiplas reflexões ao longo do comprimento da amostra, ou seja, refletância total atenuada e um espectro de superfície é produzido. A radiação que deixa a amostra fornece informações qualitativas e quantitativas nos dados espectrais que são armazenadas em arquivos eletrônicos (BARTH, 2007).

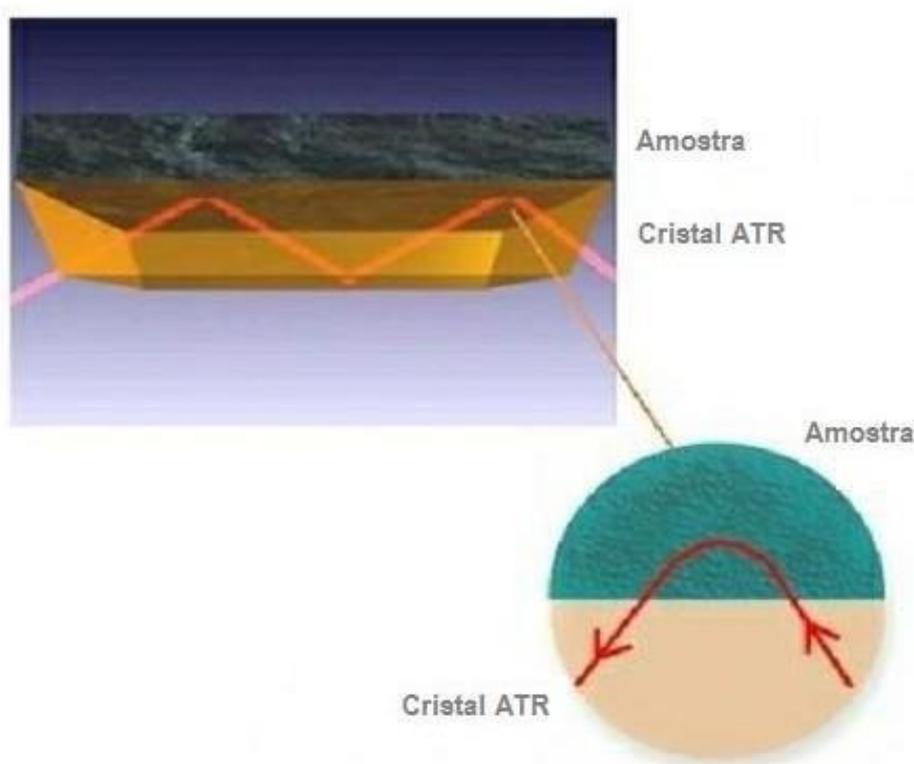


Figura 4- Esquema de funcionamento do acessório ATR

Fonte: Adaptado de Bruker Optics (2014)

Como principal vantagem da utilização deste acessório, pode-se citar a rápida amostragem, dispensando o preparo de amostra, seja para formação de

um filme ou pastilha. Em contrapartida, a pressão de contato entre a amostra e o cristal, especialmente no caso de amostras sólidas, tem grande influência no espectro gerado, o que pode acarretar em erros de interpretação e também afetar a reprodutibilidade dos resultados (RODRIGUEZ-SAONA; ALLENDORF, 2011).

2.3.3 Aplicações na Indústria de Alimentos

A aquisição de informações sobre as propriedades quantitativas e qualitativas das matérias-primas, produtos intermediários e finais está ganhando cada vez mais importância, principalmente devido aos benefícios econômicos a que estão atrelados. Neste sentido, a espectroscopia de infravermelho médio (MIR) têm potencial em uma variedade de aplicações na indústria, incluindo monitoramento de processos, determinação da qualidade e adulteração de produtos lácteos, como leite, leite em pó, manteiga e queijo (FAGAN *et al.*, 2009).

Com os recentes avanços tecnológicos no design de hardware e software, houve o desenvolvimento de equipamentos MIR mais compactos, portáteis e robustos, com sistemas sofisticados para suportar muito mais rápido o processamento e análise de dados espectrais, analisando em segundos, uma tarefa que teria levado várias horas na década de 1990. Tornaram-se ainda tão populares que suas aplicações práticas já são encontradas em praticamente todos os ramos das indústrias agrícolas e alimentares (LIN *et al.*, 2009).

Atualmente, a espectroscopia MIR é um método certificado para análise de leite para fins de pagamento no setor de lácteos pela ISO 9622: 1999, AOAC (Associação de Químicos Analíticos Oficiais) e FIL (Federação Internacional de Laticínios). As vibrações fundamentais no espectro MIR estão associadas a diferentes grupos químicos, que se correlacionam diretamente com a gordura, proteína e lactose (CASADIO *et al.*, 2010).

Segundo Dufour (2009), os principais componentes alimentares são geralmente moléculas complexas, que exibem grupos químicos específicos tais como funções carboxílicas e aminas em aminoácidos. Como cada grupo químico pode absorver na região infravermelha, o primeiro passo é identificar

claramente as bandas de absorção características destes grupos nas regiões do infravermelho médio.

No que se refere a componentes alimentares na região do espectro MIR, as cadeias de ácidos graxos são as principais responsáveis pela absorção observada entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} , devido a estiramento da cadeia C-H. Triacilgliceróis exibem bandas de C-O em 1175 cm^{-1} e C=O em 1750 cm^{-1} . Assim, a banda de absorção notada próximo a 1750 cm^{-1} é utilizada comumente para determinação de gordura, devido à vibração de estiramento do C=O da ligação éster dos triglicerídeos (WOLFSCHOON, 1977).

O grupamento C-NH peptídico é o principal responsável pela absorção entre 1700 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} , sendo próxima a 1535 cm^{-1} a absorção da amida secundária, produto da vibração de deformação do N-H das moléculas de proteína. Já a banda próxima a 1065 cm^{-1} , ocorre devido à vibração de estiramento C-OH de álcool das moléculas de lactose, sendo assim utilizada para caracterizá-la (DUFOUR, 2009).

A água é uma molécula que absorve fortemente nas regiões NIR e MIR, com faixas proeminentes centradas em 3300 cm^{-1} (Banda de estiramento H-O), a 2130 cm^{-1} (banda de associação de água) e a 1640 cm^{-1} (vibração de flexão H-O-H) (WOLFSCHOON, 1977).

Na espectroscopia MIR ocorrem apenas transições de vibração fundamental, e os espectros, na maioria dos casos, apresentam picos definidos com interpretação direta. Devido a isso, vem sendo estabelecida como uma técnica rápida, precisa, não invasiva, não-destrutiva e ambientalmente seguras, e portanto, são cada vez mais utilizadas na análise e controle da qualidade dos alimentos (LIN *et al.*, 2009). Atualmente, nota-se uma crescente aplicação das metodologias espectroscópicas juntamente às ferramentas estatísticas no controle de qualidade de alimentos, sobretudo produtos lácteos, principalmente como alternativa de substituição das técnicas convencionais.

Sauer-Leal *et al.* (2008) demonstraram a capacidade da espectroscopia FT-MIR e FT-NIR, aliadas à calibração multivariada, para a determinação dos teores de gordura, proteína, umidade, extrato seco, cinzas e pH em amostras de queijo prato, com exatidão e precisão.

Casadio *et al.* (2010) e Silvestre *et al.* (2014) compararam os níveis de macronutrientes determinados pelo analisador de leite humano com

infravermelho médio (HMA) com os métodos laboratoriais tradicionais. Observaram diferenças pequenas, mas estatisticamente significativa, nos níveis de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e energia para todas as amostras, e constataram que, com a preparação adequada e calibração do equipamento, o analisador MIR pode fornecer uma medida prática e satisfatória quanto à rapidez, simplicidade e volume de amostra necessário para avaliação de macronutrientes no leite humano.

Oliveira (2011) propôs a utilização de FT-MIR para a avaliação do teor de ureia em leite cru, o qual concluiu ser um método confiável para tal finalidade além de rápido, eficiente, versátil e de baixo custo.

Balabin e Smirnov (2011) estudaram a utilização das espectroscopias MIR e NIR para detecção de melamina em matrizes de laticínios complexas. Verificaram que as metodologias propostas são eficazes para detectar melamina em produtos lácteos, como fórmula infantil, leite em pó, ou leite líquido, e podem ser consideradas processos rápidos, sensíveis, robustos e de baixo custo.

Lopes (2015) visou caracterizar quimicamente óleos e gorduras FT-MIR, juntamente com CG-MS, e espectrometria UV/visível, além de avaliar o efeito da suplementação em animais experimentais. Com o estudo, viu-se a eficácia dos espectros infravermelhos na finalidade de definir a ação antioxidante nas amostras testadas.

Azarias (2017) utilizou a Espectroscopia FT-MIR-ATR como uma ferramenta para avaliação rápida de queijos Pecorino, Maturado e Gouda, produzidos com leite de ovelha, e constatou que esta foi capaz de verificar indicativos de proteólise e lipólise durante o processo de maturação dos queijos.

Apesar de muitos estudos com a utilização da espectroscopia FT-MIR em alimentos, são escassas as aplicações e publicações voltadas às amostras de fórmulas infantis, principalmente de forma a avaliar e quantificar sua composição majoritária em comparação aos métodos tradicionais, como um método alternativo, robusto e rápido neste tipo de matriz.

2.4 Análise de dados

As bandas espectrais na espectroscopia infravermelha normalmente são largas e frequentemente sobrepostas. Raramente existem bandas espectrais limpas que permitem uma correlação simples com a concentração do analito (HOLLER, SKOOG, & CROUCH, 2009).

Durante muito tempo, a espectroscopia infravermelha foi considerada um método de pesquisa e caracterização da estrutura química de moléculas purificadas, sendo a região NIR considerada como de pouco potencial até o início da década de 1960. Com o desenvolvimento da eletrônica e computação, numerosas aplicações com base em espectros IV foram desenvolvidos ao longo dos últimos 30 anos (DUFOR, 2009).

Uma das características mais interessantes dos modernos instrumentos é o número das variáveis que podem ser medidas em uma única amostra. Um exemplo é a intensidade de absorção em mil ou mais comprimentos de onda que é rotineiramente registrada em um único espectro. De posse dessa quantidade de dados, a necessidade de ferramentas novas e mais sofisticadas para tratá-los e extrair informações relevantes cresceu muito rapidamente, dando origem à Quimiometria, que é uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada (FERREIRA, ANTUNES, MELGO, & VOLPE, 1999).

Além disso, a quimiometria possibilita extrair informações relevantes de dados espectrais relacionadas à estrutura molecular de carboidratos, proteínas e gorduras em produtos alimentares e abordar a relação entre sua estrutura e textura (DUFOR, 2009).

Os métodos de análise multivariada são assim chamados pois, em caso do emprego das técnicas espectroscópicas no infravermelho, é possível manipular dados de absorbância associados a mais de uma frequência ao mesmo tempo. Estes métodos têm recentemente tornado possível modelar propriedades químicas e físicas de sistemas simples e complexos a partir de seus dados espectroscópicos (SABIN & FERRAO, 2004). Métodos preditivos como análises por componentes principais e os mínimos quadrados parciais são agora amplamente utilizados no desenvolvimento de métodos analíticos

para a previsão de composição e qualidade de alimentos em geral (DUFOUR, 2009).

2.4.1 Análise por Componentes Principais

Há diversos métodos para se realizar a análise estatística multivariada dentre os quais está a análise por componentes principais (*Principal Component Analysis - PCA*) (SANTOS *et al.*, 2012). Esta é principalmente utilizada pela sua capacidade de compressão dos dados em função da existência de correlação entre diversas variáveis medidas.

A PCA é um tipo de análise exploratória de dados que visa 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).

Segundo Santos *et al.* (2012) quando aplica-se PCA a um conjunto de variáveis, como por exemplo, espectros no infravermelho, o conjunto original é substituído por um novo conjunto de variáveis denominado de Componentes Principais (CPs), conforme ilustrado na Figura 5. A contribuição de cada componente principal é expressa em porcentagem e sua importância é avaliada segundo essa contribuição, ou seja, a parcela de variância total explicada pelo componente.

Como vantagem, o novo conjunto geralmente concentra a maior parte da informação (variância) em poucas variáveis, diminuindo assim a dimensionalidade dos dados, sem perda significativa da informação original (SABIN & FERRAO, 2004).

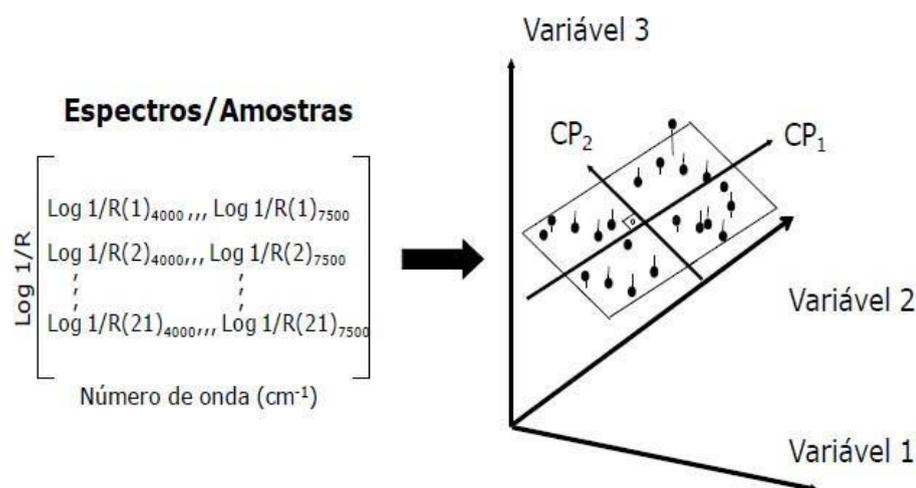


Figura 5 – Esquema da projeção de dados de uma matriz de espectros NIR-FT por Análise dos Componentes Principais (PCA)

Fonte: Adaptado de Sabin e Ferrao (2004)

Segundo Ferreira *et al.* (1999) a primeira componente (CP1) é definida pela direção que descreve a máxima variância dos dados originais, enquanto a segunda componente (CP2) tem a direção de máxima variância dos dados no subespaço ortogonal à CP1. Já as outras CP subsequentes são ortogonais às anteriores e orientadas de forma que descrevam sempre a máxima variância restante. Assim, de acordo com a posição em que ocupam em relação aos eixos das CPs, pode-se interpretar que há alguma característica nos espectros responsável pelos agrupamentos ou afastamentos ocorridos.

Portanto, a análise dos componentes principais tem por finalidade básica a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. Têm sido muito utilizada aliada à espectroscopia MIR e NIR, devido a fornecerem espectros complexos, com grande número de variáveis, facilitando a visualização dos dados em duas ou três dimensões, de modo que só as informações relevantes sejam consideradas (ALMEIDA, 2009).

2.4.2 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

Quando o objetivo principal da análise de dados é fazer a previsão de uma variável dependente a partir de um grande número de variáveis independentes, a regressão de mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares* - PLS) é um método indicado.

O PLS é aplicado neste trabalho com o objetivo de correlacionar os dados espectroscópicos infravermelhos (matriz X) com os dados físico-químicos de composição (matriz Y), construindo um modelo de calibração que permita a previsão de um ou mais componentes desejados a partir de um espectro medido. A matriz Y é constituída pelas variáveis relacionadas às concentrações dos constituintes (proteínas, gordura, umidade, sólidos totais, cinzas e lactose), e a matriz X pelas variáveis espectrais de cada uma das amostras (números de onda), conforme representado esquematicamente na Figura 6 (FERRARINI, 2004).

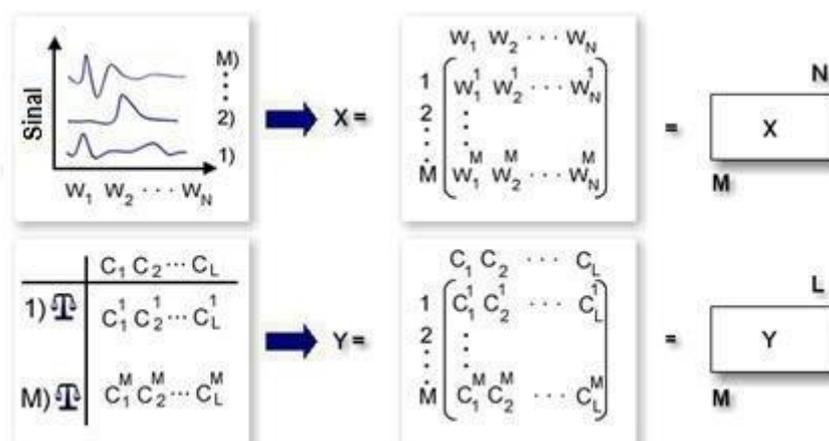


Figura 6 – Representação esquemática das matrizes X e Y no desenvolvimento do método PLS

Fonte: Adaptado de Bruker Optics (2014)

No PLS, a calibração envolve a correlação dos dados na matriz espectral X com os dados na matriz de concentração (ou propriedades) Y , conforme ilustrado na Figura 6. As matrizes X e Y são reduzidas a apenas alguns fatores usando todas as informações disponíveis (FERRARINI, 2004). Segundo Morgano *et al.* (2005) desenvolvimento do modelo, o conjunto total de

amostras é dividido em dois subconjuntos: um de calibração, normalmente 70% do total de amostras e outro de validação externa, contendo os 30% restantes.

Um número ótimo de fatores (ou também denominadas variáveis latentes) é obtido a partir de uma validação cruzada completa, e para descrever e comparar o desempenho do modelo, utiliza-se o erro quadrático médio (do inglês *Root Means Square Error* - RMSE) e o erro relativo (do inglês *Relative Error* - RE) dos conjuntos de dados de calibração e validação e o coeficiente de determinação (R^2) entre valores medidos e previstos. RMSE é uma medida de o quanto o modelo fará bem as previsões. Em geral, quanto mais baixo forem os valores RMSE e RE, e quanto mais próximo de 1 for o R^2 , melhor serão as previsões realizadas (MORGANO *et al.*, 2005; BASBASSI *et al.*, 2014). As principais medidas utilizadas para avaliar o modelo proposto foram:

- a) Coeficiente de determinação (R^2) explica a qualidade do modelo em relação à sua habilidade de estimar corretamente os valores da variável resposta (Y) (Equação 1) (MORGANO *et al.*, 2005)

Equação 1- Equação simplificada do cálculo do Coeficiente de determinação

$$R^2 = 1 - \frac{SQ_{res}}{SQ_{tot}}$$

onde, R é o coeficiente de determinação, SQ_{res} o somatório dos quadrados dos resíduos e SQ_{tot} o somatório dos quadrados total

- b) Erro relativo percentual que relaciona-se à porcentagem do erro relacionado aos valores oferecidos pelo método de referência e o método desenvolvido (Equação 2) (BASBASSI *et al.*, 2014)

Equação 2- Equação simplificada do cálculo do Erro Relativo

$$ER(\%) = \frac{|y - \hat{y}|}{y} \times 100$$

onde, ER é o erro relativo, y é o valor real e \hat{y} é o valor previsto pelo modelo.

c) Raiz quadrada do erro quadrático médio que informa o desvio padrão dos erros de previsão (Equação 3)

Equação 3- Equação simplificada da raiz quadrada do erro quadrático médio

$$= \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}$$

onde, RMSE é a raiz quadrada do erro quadrático médio, y é o valor real, \hat{y} é o valor previsto pelo modelo, n é o número de amostras do conjunto de dados (seja de calibração ou de validação)

Para o desenvolvimento do modelo é necessário um número considerável de amostras analisadas, para que proporcione o menor erro possível de previsão, ou seja, as diferenças entre os valores de referência e valores de previstos sejam as menores (ALMEIDA, 2009). Além disso, para que o modelo seja robusto é necessário descrever, da melhor forma possível, a realidade dos dados e que seja considerado o maior número de variações.

Dessa forma, as amostras utilizadas para a calibração devem possuir a mesma natureza das amostras de validação e das futuras análises (FERRARINI, 2004). Assim, o modelo final é constituído por uma matriz de vetores, que são linearmente relacionados, sendo bastante adequado para previsão dos fatores de interesse (por exemplo: proteínas, gordura, umidade, sólidos totais, cinzas e lactose) (BRUKER OPTICS, 2014).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Aplicação da Espectroscopia na região do infravermelho para caracterizar e quantificar a composição de Fórmulas Infantis, com relação aos componentes majoritários

Objetivos específicos:

- Caracterizar fórmulas infantis mediante análises físico-químicas de referência;
- Avaliar a conformidade em relação a legislação vigente e às alegações presentes nos rótulos das embalagens;
- Analisar os espectros obtidos e relacionar os principais picos com os componentes majoritários presentes em fórmulas infantis;
- Aplicar técnicas físicas e análises estatísticas multivariadas para caracterização de diferentes categorias/formulações de fórmulas infantis;
- Construir um modelo preditivo para a quantificação dos componentes majoritários, a partir das medidas espectroscópicas e ferramentas multivariadas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e codificação das amostras

Foi realizado um estudo de mercado em farmácias, drogarias, supermercados e outros estabelecimentos comerciais com o intuito de observar as principais marcas e tipos de Fórmulas Infantis comercializadas no município de Juiz de Fora.

A partir deste estudo, foram selecionados os produtos de maior ocorrência nos estabelecimentos e adquiridos no comércio local 20 marcas (latas de 400g) de quatro grandes indústrias do ramo.

O universo amostral (Tabela 9) abrangeu Fórmulas Infantis para Lactentes, recomendados para crianças de zero a seis meses, codificadas como –FI; Fórmulas Infantis de Seguimento (–FSI), indicadas a partir dos ~~36~~ meses de idade; Fórmulas Infantis e de Seguimento (–FIS). Dentre estas, havia produtos sem restrição ao uso, bem como amostras recomendadas para dietas especiais, como restrição de lactose e/ou de proteínas lácteas (produtos à base de soja), ou ainda contendo proteínas parcialmente ou extensamente hidrolisadas. Também foi utilizada uma amostra indicada a recém-nascidos prematuros, ou de alto risco, codificada como –PREI.

Foram adquiridas, por meio da Fundação de Apoio e Desenvolvimento ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FADEPE) da Universidade Federal de Juiz de Fora, 20 marcas (latas de 400g), das principais Fórmulas Infantis comercializadas em Juiz de Fora, em dois ou três lotes diferentes, totalizando 54 amostras. Determinou-se a composição centesimal de cada unidade por meio de métodos físico-químicos tradicionais. Ao mesmo tempo, com o intuito de avaliar a composição quali e quantitativamente, as amostras foram submetidas à Espectroscopia no Infravermelho Médio com transformada de Fourier acoplado à reflectância total atenuada (FT-MIR-ATR).

Tabela 9 – Codificação lotes e alegações das amostras utilizadas

Categoria	Código da amostra	Quantidade de lotes avaliados	Alegação especial
Fórmula Infantil	FI 1	3	
	FI 2	3	
	FI 3	3	
	FI 4	3	
	FI 5	3	
	FI 6	3	
	FI 7	2	Proteínas do soro parcialmente hidrolisadas; adição de nucleotídeos
	FI 8	2	Proteína de soja
Fórmula de Seguimento	FS 1	3	Proteínas do soro parcialmente hidrolisadas
	FS 2	3	
	FS 3	3	
	FS 4	3	Proteína de soja
	FS 5	2	Proteína do soro parcialmente hidrolisada; adição de nucleotídeos
Fórmula Infantil e de Seguimento	FIS 1	3	
	FIS 2	3	
	FIS 3	3	Sem lactose
	FIS 4	2	Proteína de soja
	FIS 5	2	Baixo teor de lactose e proteínas extensamente hidrolisadas
	FIS 6	2	Baixo teor de lactose e proteínas parcialmente hidrolisadas
Fórmula Infantil Pré-termo	PRE	3	Proporção de componentes modificada; adição de nucleotídeos

4.2 Análise físico-químicas das amostras por métodos convencionais

A composição centesimal de cada amostra de fórmula infantil foi determinada a partir do doseamento de lipídios, proteínas, umidade, resíduo mineral fixo (cinzas) e lactose, segundo Instituto Adolfo Lutz (2004) e Brasil

(2006), os quais estabelecem os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Tais análises foram realizadas no laboratório de pesquisa da EPAMIG/ Instituto de Laticínios Cândido Tostes, em Juiz de Fora/MG.

Após a obtenção dos resultados, foram realizados cálculos para conversão dos teores de lipídios, proteínas e carboidratos para a unidade usual e utilizada pela legislação: $\text{--g} \cdot 100\text{kcal}^{-1}$, relacionada à densidade de nutrientes de acordo com seu valor energético. Para isso, foram utilizados os dados de teor energético para porção de 100g, contidos nas informações dos rótulos das amostras.

4.2.1 Determinação de gordura por método de Gerber

Foram preparadas soluções das amostras diluídas a 10% (m/v) em água destilada, em duplicata. De cada uma, retirou-se uma alíquota de 11mL utilizando pipeta volumétrica, que foi adicionada cuidadosamente a um butirômetro de Gerber para leite, já contendo 10mL de ácido sulfúrico p.a., de densidade a 20°C igual a $1825 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Em seguida, adicionou-se 1mL de álcool isoamílico, densidade a 20°C igual a $811 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, limpou-se o gargalo e vedou-se o butirômetro. Este foi envolvido com toalha e agitado vigorosamente, seguindo para centrifugação por 5 minutos, a 1300rpm, em centrífuga de marca ITR. Logo após, foram colocados em banho-maria a 65°C por 3 minutos para leitura direta do teor de gordura na escala da própria vidraria.

Devido à diluição realizada, os resultados lidos foram multiplicados por 10, para obtenção do resultado final corrigido.

4.2.2 Determinação de proteína verdadeira por método de Kjeldahl

a) Teor de Proteína Bruta

Inicialmente foram preparadas a partir das soluções diluídas a 10% (m/v) em água destilada, em duplicata. De cada solução, foi retirada uma alíquota de 2 mL para microtubos de Kjeldahl, contendo 1,5g de sulfato de potássio p.a. e 0,1g de sulfato de cobre p.a., sendo em seguida adicionado 3 mL de ácido

sulfúrico p.a., e 3 pérolas de vidro. Após agitação cuidadosa, os tubos foram encaminhados para digestão em bloco digestor marca Tecnal Modelo TE040/25, em capela de exaustão, a 350°C durante aproximadamente 4 horas. O ponto final desta etapa foi a formação de coloração límpida e esverdeada, característica da ausência de matéria orgânica e formação de sais de amônio.

Na etapa seguinte, as amostras digeridas foram encaminhadas para destiladores de nitrogênio de marca Lucadema. Após adição de 15 mL de hidróxido de sódio 30% e formação de amônia, foi realizada destilação por arraste de vapor, sendo esta substância coletada em um erlenmeyer posicionado na saída do condensador, contendo 10 mL de ácido bórico adicionado de indicador misto de cor roxa (vermelho de metila e azul de metileno). A destilação era interrompida ao recolher-se aproximadamente 100 mL do destilado (metaborato de amônio), com viragem para cor verde.

Por fim, cada destilado foi titulado por uma solução volumétrica de ácido clorídrico 0,05 mol·L⁻¹, até ponto final detectável pela mudança da coloração verde para roxa.

Para retirar possíveis interferências e erros da análise, foram realizadas juntamente às amostras, duas provas em branco, utilizando-se água destilada.

De posse dos resultados, foi realizado o cálculo do teor de Nitrogênio total (%NT) (Equação 4) e do teor de Proteína Bruta, multiplicando-se a %NT pelo fator 6,25 (Equação 5). Tal fator é oriundo das RDC 43/2011 e RDC 44/2011, específicas para fórmulas infantis (BRASIL, 2011a, b).

Equação 4 – Cálculo do teor de nitrogênio total

$$\% = \frac{\quad - \quad 1,4}{\quad}$$

Onde: % NT – teor de nitrogênio total na amostra, em percentagem; V_A – volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra, em mililitros; V_B – volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco, em mililitros; M_{HCl} Concentração do HCl (mol/L); fc – fator de correção para o ácido clorídrico 0,05 mol/L; m – massa da amostra (em gramas)

Equação 5 – Cálculo do teor de proteína bruta

$$\% = \% \cdot f$$

Onde: %PB – teor de proteína verdadeira; %NT- teor de nitrogênio total; fator proteína – fator utilizado para conversão do teor de nitrogênio em teor de proteína bruta

b) Teor de nitrogênio não proteico

Foram utilizadas alíquotas de 5mL das soluções diluídas a 10% (m/v) preparadas a partir das amostras. Tais alíquotas eram vertidas a béqueres de 50mL, e adicionadas de 5mL de água destilada e 10mL de ácido tricloroacético a 24%, com o objetivo de precipitar todas as proteínas presentes, obtendo-se assim a fração de Nitrogênio não proteico.

Após aguardar em torno de 15minutos, foi realizada filtração e deste filtrado foi retirado 2mL, para as etapas de digestão, destilação e titulação, conforme já descrito no item 4.3.2 a (Teor de Proteína Bruta). Para os cálculos, utilizou-se a Equação 4, porém encontrando-se o teor de nitrogênio não-proteico (%NNP).

c) Teor de proteína verdadeira

Ao promover a subtração do teor de nitrogênio total (%NT) pelo teor de nitrogênio não protéico (%N-NNP), obtém-se teoricamente o valor de nitrogênio advindo de proteínas (Equação 6).

Equação 6 – Cálculo do teor de nitrogênio protéico

$$\% = \% - \%$$

Onde: %NP – teor de nitrogênio proteico; %NT- teor de nitrogênio total %N-NNP teor de nitrogênio não proteico

Multiplicando-se o teor de %NP pelo fator de conversão (6,25) obteve-se o teor de proteína verdadeira de cada amostra (Equação 7). Tal fator é oriundo

das RDC 43/2011 e RDC 44/2011, específicas para fórmulas infantis (BRASIL, 2011a, b).

Equação 7 – Cálculo do teor de proteína verdadeira

$$\% = \% \quad i$$

Onde: %PV – teor de proteína verdadeira; %NP – teor de nitrogênio protéico; fator_{proteína} – fator utilizado para conversão do teor de nitrogênio em teor de proteína verdadeira.

4.2.3 Determinação de umidade por método gravimétrico em estufa

Esta análise foi realizada em duplicata, conforme a descrição a seguir: Inicialmente foi pesado em cápsula de alumínio, utilizando-se balança analítica marca Gehaka, 10 g de areia purificada e adicionado a mesma um bastão de vidro (aproximadamente 5 cm). Cada conjunto foi mantido em estufa marca Quimis a 105 °C por uma hora, e posteriormente transferidos para dessecador, durante 15 minutos, para esfriar sem reabsorver umidade.

Em seguida, o conjunto foi pesado (TARA), e logo após adicionado de aproximadamente 3g de amostra (PESO INICIAL), que foi misturada cuidadosamente com auxílio do bastão de vidro. Posteriormente, as cápsulas foram novamente levadas à estufa a 105°C, durante aproximadamente de 3horas, até peso constante, o que foi determinado a partir de repetições da transferência dos conjuntos para dessecador, balança e estufa por mais 30minutos, em cada vez, até que a diferença nas pesagens fosse nula.

Por fim, o conjunto foi pesado (PESO FINAL) e procedeu-se com os cálculos para determinação da umidade (Equação 8).

Equação 8 – Cálculo do teor de umidade da amostra

$$\% = \frac{() - ()}{()} \times 100$$

4.2.4 Determinação de Resíduo Mineral Fixo (cinzas)

Esta análise foi realizada em duplicata, conforme a descrição a seguir: Inicialmente o cadinho foi aquecido em forno mufla a 550°C durante 30 minutos, esfriado em dessecador e pesado em balança analítica marca Gehaka (TARA). Em seguida, foi pesado aproximadamente de 3g de amostra previamente homogeneizada diretamente no cadinho (PESO AMOSTRA), sendo levados para a estufa a 105°C durante duas horas. Logo após, foram colocados em forno mufla a 550°C, por três horas, obtendo-se cinzas brancas. Após esfriar em dessecador, os cadinhos foram novamente pesados (PESO FINAL) e procedeu-se os cálculos para o doseamento das cinzas (Equação 9).

Equação 9 – Cálculo do teor de cinzas (RMF) da amostra

$$\% = \frac{() - () ()}{()} \times 100$$

4.2.5 Determinação de carboidratos por diferença centesimal

Após determinação analítica dos teores de gordura, proteínas, umidade e cinzas, o teor de carboidratos foi obtido subtraindo cada valor do total de 100%, concluindo, portanto, a composição centesimal das amostras (Equação 10).

Equação 10- Cálculo do teor de carboidratos

$$\% = 100 - (\% + \%í + \%+ \%)$$

4.3 Análise das amostras por Espectroscopia no infravermelho médio (FT-MIR- ATR)

Para a avaliação no FT-MIR-ATR, cada lata contendo amostra foi aberta e seu conteúdo homogeneizado. Em seguida, foi pesado em papel de pesagem, utilizando balança analítica 200 mg de pó, seguido da prensagem, em prensa hidráulica com pressão equivalente a 3 toneladas durante 3 segundos, de modo a compactar o pó em forma de pastilha.

A espectroscopia por infravermelho foi realizada em um espectrômetro MIR (VERTEX 70) da marca Bruker®, com acessório ATR e Software OPUS® 6.5. As medidas foram realizadas em absorbância com resolução de 4 cm^{-1} e varredura de 64 leituras no intervalo de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . Os dados foram analisados nos softwares Excel e OriginPro 2015. As medidas foram realizadas em triplicata, mudando-se em cada medida, a posição da pastilha, para que houvesse avaliação de outro campo. Além disso, padronizou-se a pressão do anvil sobre a pastilha de modo a evitar medidas imprecisas.

A pastilha de cada amostra foi inserida sobre o cristal do ATR previamente limpo com álcool isopropílico ou acetona. 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.

Para melhor interpretação e visualização dos dados, foram descartadas regiões do espectro que não continham informações relevantes, de modo a salientar as faixas de maior interesse, relacionadas aos componentes presentes nas amostras. Por isso, optou-se pelas sessões de números de onda 1000 cm^{-1} a 1780 cm^{-1} e 2815 cm^{-1} a 3028 cm^{-1} . Além disso, para plotar os gráficos, foi realizada uma separação das amostras na legenda em dois grupos, sendo primeiro apresentadas aquelas compostas por três lotes e aquelas somente com dois, já que cada um dos lotes foi considerado uma replicata.

4.3.1 Análise estatística

Os espectros das diferentes fórmulas infantis foram convertidos em arquivos de texto utilizando o software OPUS 6.5.97. As absorbâncias da região MIR, obtidas no intervalo de número de ondas compreendido entre 3028 cm^{-1} a 2815 cm^{-1} e 1780 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} , foram submetidas a cálculos de análise de componentes principais (PCA) e regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS), utilizando o software Excel, OriginPro 2015 e Rstudio v1.0.153.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química das fórmulas infantis por métodos convencionais

Os resultados obtidos a partir das análises físico-químicas são descritos nas Tabelas 10, 11 e 12, com destaque para as duas últimas, que apresentam teores com unidades similares à legislação vigente. As amostras são apresentadas em ordem de acordo com a codificação de sua categoria, ou seja, primeiramente as fórmulas infantis (FI), logo após as fórmulas de seguimento (FS), seguida pelas fórmulas infantis e de seguimento (FIS), finalmente, a amostra para lactentes nascidos pré-termo (PRE).

Tabela 10 – Composição centesimal média das amostras avaliadas

Amostra	Lipídios (g·100g ⁻¹)	Proteínas (g·100g ⁻¹)	Carboidratos (g·100g ⁻¹)	Cinzas (g·100g ⁻¹)	Sólidos Totais (g·100g ⁻¹)	Umidade (g·100g ⁻¹)
FI1	24,2 ± 2,4	10,5 ± 0,6	57,2 ± 2,8	2,6 ± 0,6	94,5 ± 0,4	5,4 ± 0,3
FI2	16,2 ± 0,3	9,4 ± 0,5	68,1 ± 0,3	3,1 ± 0,3	96,7 ± 1,0	3,3 ± 1,0
FI3	28,8 ± 1,8	10,6 ± 0,7	54,7 ± 2,8	2,8 ± 1,0	96,9 ± 0,5	3,1 ± 0,5
FI4	22,5 ± 1,3	10,9 ± 0,6	58,3 ± 2,7	3,6 ± 1,2	95,3 ± 1,9	4,7 ± 2,0
FI5	23,5 ± 1,2	10,3 ± 0,6	59,0 ± 3,5	3,6 ± 1,5	95,6 ± 2,0	4,4 ± 2,0
FS1	21,0 ± 0,5	12,2 ± 2,2	58,3 ± 2,1	3,0 ± 0,3	94,9 ± 1,9	5,1 ± 1,9
FS2	17,5 ± 1,5	12,6 ± 0,5	62,6 ± 1,3	3,3 ± 0,2	96,1 ± 1,1	3,9 ± 1,1
FS3	21,7 ± 2,25	10,5 ± 0,7	60,3 ± 3,5	3,6 ± 0,9	96,2 ± 1,4	3,8 ± 1,4
FS4	21,8 ± 0,6	10,8 ± 0,3	58,6 ± 2,6	3,7 ± 2,4	95,0 ± 1,4	5,0 ± 1,4
FIS1	28,2 ± 1,5	9,3 ± 0,7	53,4 ± 2,7	5,3 ± 2,7	96,1 ± 0,9	3,9 ± 0,9
FIS2	19,0 ± 1,0	10,9 ± 0,1	62,0 ± 2,5	3,7 ± 1,1	95,6 ± 1,1	4,4 ± 1,1
FIS3	25,7 ± 0,8	10,2 ± 0,4	56,3 ± 2,0	3,3 ± 1,4	95,6 ± 0,4	4,4 ± 0,4
PRE	24,2 ± 0,6	13,4 ± 0,5	54,4 ± 1,6	3,5 ± 0,6	95,4 ± 1,4	4,6 ± 1,4
FI6	18,8 ± 3,8	9,5 ± 0,7	61,7 ± 0,3	3,7 ± 0,3	96,1 ± 1,9	3,9 ± 1,9
FI7	25,5 ± 3,5	8,9 ± 0,5	60,5 ± 2,2	2,4 ± 0,1	97,4 ± 1,0	2,6 ± 1,0
FI8	26,8 ± 0,4	12,1 ± 0,2	54,9 ± 1,8	2,4 ± 0,7	97,4 ± 1,0	2,6 ± 1,0
FS5	21,5 ± 0,7	9,2 ± 1,3	64,6 ± 1,7	1,8 ± 0,3	97,1 ± 0,6	2,9 ± 0,6
FIS4	26,5 ± 1,4	12,8 ± 0,7	54,0 ± 1,2	2,7 ± 0,1	96,1 ± 0,4	3,9 ± 0,4
FIS5	26,5 ± 2,1	9,1 ± 0,4	56,8 ± 1,0	2,9 ± 0,2	95,3 ± 0,9	4,7 ± 0,9
FIS6	25,8 ± 0,4	9,9 ± 0,3	52,3 ± 0,5	5,0 ± 0,3	95,9 ± 0,9	4,1 ± 0,9

Realizou-se ainda uma divisão em dois grupos, sendo o primeiro representado pelas marcas compostas por três lotes (Tabela 11) e o segundo, aquelas compostas por dois (Tabela 12), já que cada lote foi considerado uma

replicata. Este segundo grupo não pode ser submetido à análise de variância (ANOVA) por não atender o princípio de homocedasticidade, uma vez que não há homogeneidade entre as variâncias das amostras.

Observa-se certa homogeneidade nos teores, uma vez que buscam atender as exigências legais, bem como a necessidades nutricionais dos lactentes, porém cada formulação é particular a cada indústria.

Tabela 11 – Composição média das amostras avaliadas (três lotes)

Amostra	Lipídios (g·100kcal ⁻¹)	Proteínas (g·100kcal ⁻¹)	Carboidratos (g·100kcal ⁻¹)	Cinzas (g·100g ⁻¹)	Sólidos Totais (g·100g ⁻¹)	Umidade (g·100g ⁻¹)
FI1	4,7 ± 0,5 ^{bcd}	2,1 ± 0,1 ^{bcd}	11,2 ± 0,5 ^{bcd}	2,6 ± 0,6 ^a	94,5 ± 0,4 ^a	5,4 ± 0,3 ^a
FI2	3,2 ± 0,1 ^{gh}	1,8 ± 0,1 ^d	13,4 ± 0,1 ^a	3,1 ± 0,3 ^a	96,7 ± 1,0 ^a	3,3 ± 1,0 ^a
FI3	5,7 ± 0,3 ^a	2,1 ± 0,3 ^{bcd}	10,8 ± 0,5 ^{cd}	2,8 ± 1,0 ^a	96,9 ± 0,5 ^a	3,1 ± 0,5 ^a
FI4	4,4 ± 0,3 ^{cdef}	2,1 ± 0,1 ^{bcd}	11,5 ± 0,5 ^{bcd}	3,6 ± 1,2 ^a	95,3 ± 1,9 ^a	4,7 ± 2,0 ^a
FI5	5,2 ± 0,2 ^{abc}	1,9 ± 0,1 ^{cd}	11,0 ± 0,7 ^{bcd}	3,6 ± 1,5 ^a	95,6 ± 2,0 ^a	4,4 ± 2,0 ^a
FS1	4,1 ± 0,1 ^{efg}	2,4 ± 0,4 ^{abc}	11,5 ± 0,4 ^{bcd}	3,0 ± 0,3 ^a	94,9 ± 1,9 ^a	5,1 ± 1,9 ^a
FS2	3,4 ± 0,3 ^{fgh}	2,5 ± 0,1 ^{ab}	12,3 ± 0,3 ^{ab}	3,3 ± 0,2 ^a	96,1 ± 1,1 ^a	3,9 ± 1,1 ^a
FS3	4,3 ± 0,4 ^{def}	2,1 ± 0,1 ^{bcd}	11,9 ± 0,7 ^{bcd}	3,6 ± 0,9 ^a	96,2 ± 1,4 ^a	3,8 ± 1,4 ^a
FS4	4,3 ± 0,1 ^{def}	2,1 ± 0,1 ^{bcd}	11,5 ± 0,5 ^{bcd}	3,7 ± 2,4 ^a	95,0 ± 1,4 ^a	5,0 ± 1,4 ^a
FIS1	5,5 ± 0,3 ^{ab}	1,8 ± 0,1 ^d	10,5 ± 0,5 ^d	5,3 ± 2,7 ^a	96,1 ± 0,9 ^a	3,9 ± 0,9 ^a
FIS2	3,7 ± 0,2 ^{fgh}	2,1 ± 0,0 ^{bcd}	12,2 ± 0,5 ^{abc}	3,7 ± 1,1 ^a	95,6 ± 1,1 ^a	4,4 ± 1,1 ^a
FIS3	5,0 ± 0,2 ^{abcd}	2,0 ± 0,1 ^{bcd}	11,1 ± 0,4 ^{bcd}	3,3 ± 1,4 ^a	95,6 ± 0,4 ^a	4,4 ± 0,4 ^a
PRE	4,7 ± 0,1 ^{bcd}	2,8 ± 0,1 ^a	10,7 ± 0,3 ^d	3,5 ± 0,6 ^a	95,4 ± 1,4 ^a	4,6 ± 1,4 ^a
valor p	<0,05	<0,05	<0,05	0,7102	0,8869	0,8497

Tabela 12 - Composição média das amostras avaliadas (dois lotes)

Amostra	Lipídios (g·100kcal ⁻¹)	Proteínas (g·100kcal ⁻¹)	Carboidratos (g·100kcal ⁻¹)	Cinzas (g·100g ⁻¹)	Sólidos Totais (g·100g ⁻¹)	Umidade (g·100g ⁻¹)
FI6	3,7 ± 1,0	1,9 ± 0,1	12,1 ± 0,1	3,7 ± 0,3	96,1 ± 1,9	3,9 ± 1,9
FI7	5,0 ± 0,7	1,8 ± 0,1	11,9 ± 0,4	2,4 ± 0,1	97,4 ± 1,0	2,6 ± 1,0
FI8	5,0 ± 0,1	1,8 ± 0,0	11,9 ± 0,4	2,4 ± 0,7	97,4 ± 1,0	2,6 ± 1,0
FS5	4,2 ± 0,1	1,8 ± 0,3	12,7 ± 0,3	1,8 ± 0,3	97,1 ± 0,6	2,9 ± 0,6
FIS4	5,2 ± 0,3	2,5 ± 0,1	10,6 ± 0,2	2,7 ± 0,1	96,1 ± 0,4	3,9 ± 0,4
FIS5	5,2 ± 0,4	1,8 ± 0,1	11,2 ± 0,2	2,9 ± 0,2	95,3 ± 0,9	4,7 ± 0,9
FIS6	5,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1	10,9 ± 0,1	5,0 ± 0,3	95,9 ± 0,9	4,1 ± 0,9

Letras superescritas demonstram grupos significativamente diferentes (ANOVA, TukeyHSD, p<0,05)

Conforme já descrito anteriormente, a legislação preconiza os seguintes teores para os compostos majoritários (g·100kcal⁻¹): lipídios: 4,0 a 6,0;

proteínas lácteas: 1,8 a 3,0 (no caso de FI), 1,8 a 3,5 (no caso de FS); proteína de soja: 2,25 a 3,0 (no caso de FI), 2,25 a 3,5 (no caso de FS); carboidratos: 9,0 a 14,0 (BRASIL, 2011a, b).

Paniago *et al.* (2017) observaram que todas as sete fórmulas infantis avaliadas em seu estudo apresentaram teor lipídico abaixo do preconizado após reconstituição. Dentre todas as amostras aqui testadas, quatro não atenderam a legislação vigente em relação ao teor de lipídios. Na Tabela 11 em relação às amostras de três lotes, observa-se que a análise estatística sobre o teor de lipídios separou três destas amostras em um grupo em comum (h), já na tabela 12 (dois lotes), a amostra FI6 foi a que revelou níveis abaixo do preconizado. Além disso, as amostras em não-conformidade foram fabricadas pela mesma indústria e possuem indicação para uso rotineiro, ou seja, sem nenhuma recomendação especial.

Kus-Yamashita *et al.* (2015) quantificaram o teor de lipídios e ácidos graxos poli-insaturados (*PUFA*) em 14 amostras de fórmulas infantis, comercializadas no estado de São Paulo. Ao comparar com os valores recomendados, constataram que todas as amostras analisadas, em pelo menos um parâmetro, estavam em desacordo com o preconizado pelo *Codex Alimentarius*. Assim, reforça-se a necessidade de vigilância constante quanto à composição deste tipo de amostras, visto a importância da sua utilização em relação à saúde dos lactentes.

Já em relação ao teor de proteínas, cinco amostras apresentaram teor bem próximo ao limite inferior, porém em conformidade à exigência da legislação vigente. Ao confrontar com informações do rótulo, viu-se que quatro delas são constituídas por proteínas hidrolisadas (FI7, FS5, FIS1, FIS5). Este fato pode ter influenciado o resultado do doseamento por Kjeldahl, uma vez que a hidrólise promove o aumento do teor nitrogenado não proteico e, em consequência diminui o teor de proteína verdadeira. Assim como no caso dos lipídeos, dentre as amostras com três lotes, a análise estatística indicou as duas amostras no limite inferior da legislação (FI2 e FIS1).

Nunes *et al.* (2017) avaliaram a composição de seis fórmulas infantis comercializadas na cidade de Viçosa-MG e encontraram três amostras da mesma indústria fabricante com valores proteicos relativamente baixos em relação ao preconizado legalmente.

No caso o teor de carboidratos, todas as amostras atenderam às especificações da legislação, mesmo aquelas que com teor reduzido de lactose, contendo maltodextrina em substituição. Para este tipo de formulação, recomendada para dietas específicas, a composição preconizada é semelhante às FI e FIS, baseada nas necessidades do lactentes, ou deve ser comprovada cientificamente no caso de alguma adaptação (BRASIL, 2011c)

Dentre estes três atributos (teor de proteínas, lipídios e carboidratos), destaca-se a amostra FI2 (Tabela 11), que demonstrou teores de lipídios abaixo do preconizado e o de proteínas no limite inferior. Em contrapartida, o nível de carboidratos apresentou-se superior aos apresentados pelas demais amostras. Isto se deve ao fato de ter sido doseado por diferença em relação aos outros compostos, para concluir a composição centesimal.

Não houve diferenças significativas nos teores de cinzas, sólidos totais e umidade para as amostras de três lotes (Tabela 11). Resultados semelhantes foram obtidos também para as fórmulas infantis com dois lotes (Tabela 12).

No Brasil, não há uma regulamentação sobre sólidos totais e cinzas para fórmulas infantis, porém, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó, portaria nº 146 do MAPA (BRASIL, 1996), o teor máximo de umidade para este produto deve ser 3,5% ou seja, deve haver no mínimo 96,5% de sólidos totais em tal produto. Tendo como referência esse valor, somente 25% dos produtos avaliados estão em conformidade quanto ao teor de sólidos. Este baixo índice pode ser relacionado à alta higroscopicidade das formulações, principalmente devido ao alto teor de carboidratos.

5.2 Caracterização das amostras por Espectroscopia no infravermelho médio (FT-MIR- ATR)

Ao plotar a média das triplicatas (três lotes) e duplicatas (dois lotes) de todas as amostras em um único gráfico (Figura 7), observa-se, à primeira vista, um comportamento espectral bastante similar entre as fórmulas infantis estudadas. Foi possível avaliar as faixas relacionadas à diferentes grupos químicos, associados à vibrações específicas das moléculas que compoem as

amostras. Ao mesmo tempo, notou-se regiões onde algumas amostras têm comportamentos particulares.

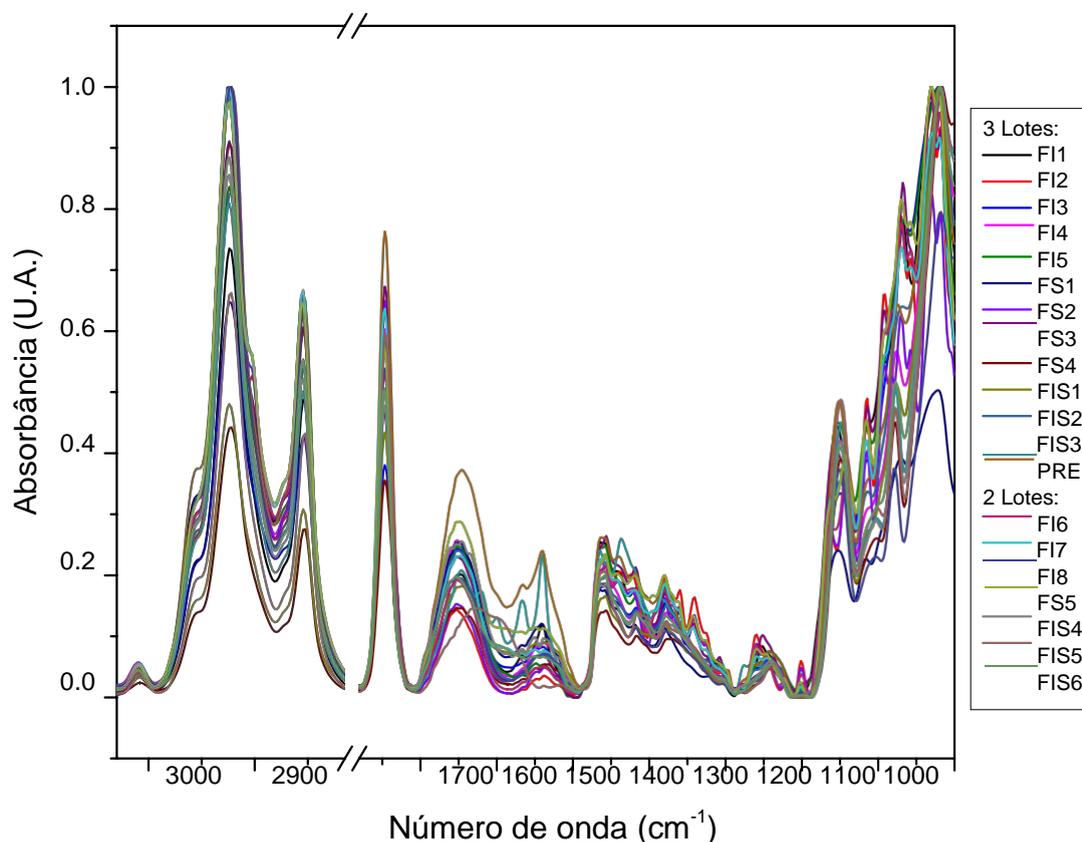


Figura 7- Espectros característicos do FT-MIR-ATR das diferentes fórmulas infantis estudadas

A título de ilustração e para melhor visualização das regiões de importância dos espectros, foi escolhido aleatoriamente um espectro de cada categoria, contendo as informações das principais bandas de absorção dos grupos funcionais característicos dos componentes das amostras (Figura 8). Bandas comumente associadas à lipídios ocorreram em torno de 2920 cm^{-1} a 2908 cm^{-1} (estiramento assimétrico CH_2), em 2848 cm^{-1} a 2810 cm^{-1} (estiramento simétrico C-H e CH_2) e de 1759 cm^{-1} a 1722 cm^{-1} (estiramento C=O); às proteínas em 1670 cm^{-1} a 1649 cm^{-1} (Amida I), em 1645 cm^{-1} a 1610 cm^{-1} (NH_2 , NH, dobramentos de Amida I) e em 1589 cm^{-1} a 1504 cm^{-1} (dobramento simétrico em NH_3 e Amida II); e por fim, aos carboidratos em 1099 cm^{-1} e de 1132 cm^{-1} a 1118 cm^{-1} (ambos estiramento C-O) como descrito por Barbosa, (2007) e Dufour (2009).

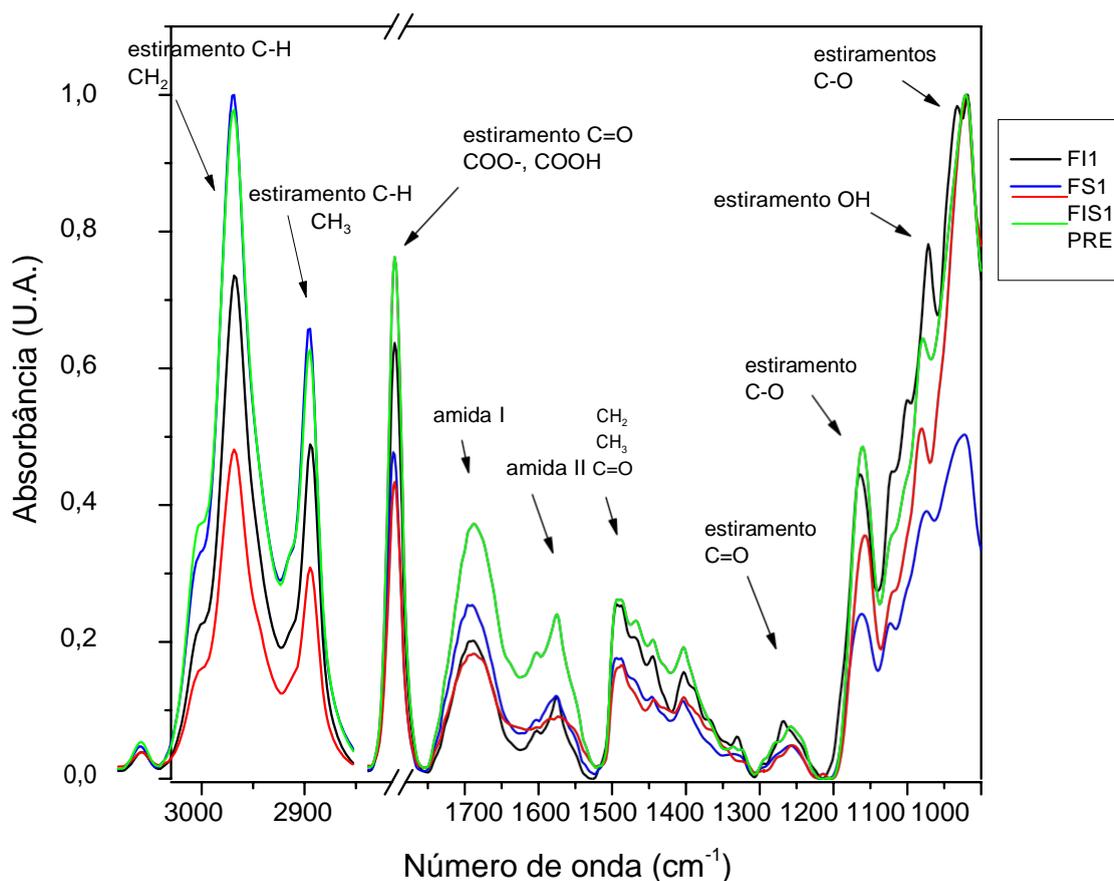


Figura 8- Espectros do FT-MIR de cada categoria e suas principais bandas de absorção

Segundo Barbosa (2007) a região de 4000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} é denominada região dos grupos funcionais, nas quais as bandas de absorção se referem aos estiramentos dos principais grupos funcionais presentes nos compostos, como OH, NH e C=O, embora as posições exatas podem sofrer variações de acordo com fatores espaciais. Assim, vê-se que apesar de apresentarem algumas particularidades, os espectros seguem um comportamento semelhante em relação à absorção dos principais grupos funcionais, característicos dos componentes presentes.

Para melhor interpretação da avaliação no FT-MIR, foi realizada uma análise dos componentes principais utilizando os espectros completos de todas as amostras, de modo a observar os agrupamentos possíveis de acordo com a similaridade encontrada.

A PCA revelou que três componentes principais explicaram apenas 73% da variabilidade das amostras. A baixa variabilidade explicada pelos dois primeiros componentes (58%) se deve a intensa semelhança entre os

espectros apesar da complexidade das formulações, principalmente em relação às diferentes qualidades e teores de carboidratos, lipídeos e proteínas. Foram necessários seis componentes para explicar aproximadamente 90% da variabilidade dos dados, conforme Tabela 13.

Tabela 13 - Porcentagem da variância calculada pela análise de componentes principais utilizando parte dos espectros nas faixas de número de ondas compreendida entre 3028 cm^{-1} a 2815 cm^{-1} e de 1780 cm^{-1} a 1000 cm^{-1}

Principais Componentes	Porcentagem de variância	Variância Acumulada
1	37,12%	37,12%
2	21,23%	58,35%
3	14,57%	72,92%
4	7,10%	80,02%
5	6,17%	86,19%
6	4,04%	90,23%

De acordo com o resultado dos scores apresentado na Figura 9, observou-se que a amostra codificada como PRE foi a que menos se correlacionou com as demais. Com composição singular, é indicada a lactentes de baixo peso ou prematuros. Além disso, conforme já exposto, o teor dos componentes majoritários (lipídios, carboidratos, proteínas e sais), se apresentam aumentados em relação às outras formulações, além da presença de nucleotídeos.

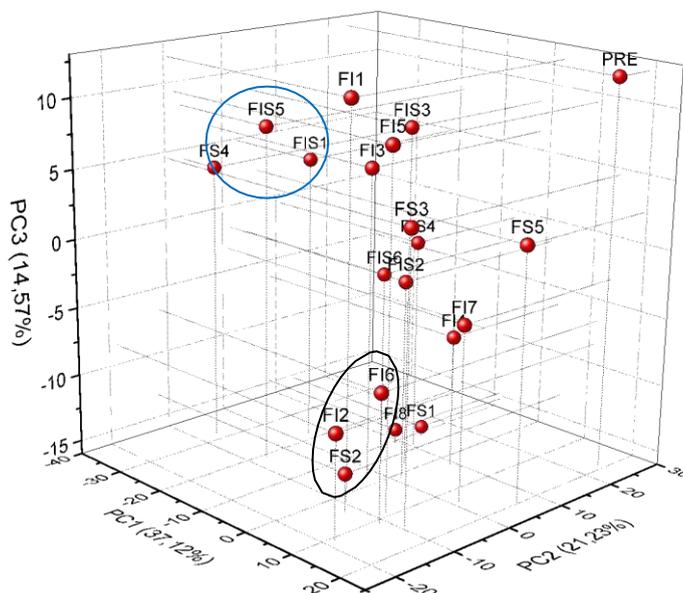


Figura 9 – *Score plot* tridimensional da análise dos componentes principais das amostras de fórmulas infantis na região MIR (de 3028 cm^{-1} a 2815 cm^{-1} e de 1780 cm^{-1} a 1000 cm^{-1}).

A amostra FS4 também mostrou menor correlação entre as demais. Isto pode se dever ao fato de não apresentar base láctea em sua formulação, ou seja, apresenta proteína de soja, maltodextrina e óleos vegetais adicionados de DHA e ARA. Próxima a FS4, há outras amostras com composição especial, como a FIS5 e FIS1. A primeira contém proteína extensamente hidrolisada, polímeros de glicose e amido como principais carboidratos e lipídios exclusivamente de fonte vegetal, adicionada de DHA e ARA. FIS1 é composta por soroproteínas parcialmente hidrolisadas, lactose em conjunto à maltodextrina e óleos vegetais, também adicionados de DHA e ARA.

Outro grupo de amostras correlacionadas inclui FI2, FI6 e FS2. Conforme informações do rótulo e de acordo com PortalPed (2017), estas amostras possuem a mesma proporção de caseínas e soroproteínas e são compostas exclusivamente por lactose como carboidrato, diferenciando-se apenas quanto à composição de lipídios, uma vez que as amostras FI2 e FS2, de mesma indústria, possuem gordura láctea e óleos vegetais e a amostra FI6 somente é composta por óleos vegetais adicionados de DHA e ARA.

Devido grande semelhança entre os espectros, apesar da variabilidade apresentada, optou-se pela divisão em três regiões de interesse, com o objetivo de caracterizar as fórmulas infantis com maior clareza em relação aos seus componentes majoritários.

5.2.1 Região MIR característica dos lipídios

Neste trabalho, foram encontrados picos em torno de 2921 cm^{-1} , 2848 cm^{-1} e 1750 cm^{-1} na região espectral característica da absorção dos lipídios, sendo os dois primeiros picos relacionados ao estiramento CH-CH_2 , e o último comumente relacionado à carbonila de triacilgliceróis (DUFOUR, 2009). A Figura 10 pode-se observar o comportamento das diferentes amostras de fórmulas infantis em relação a estes picos.

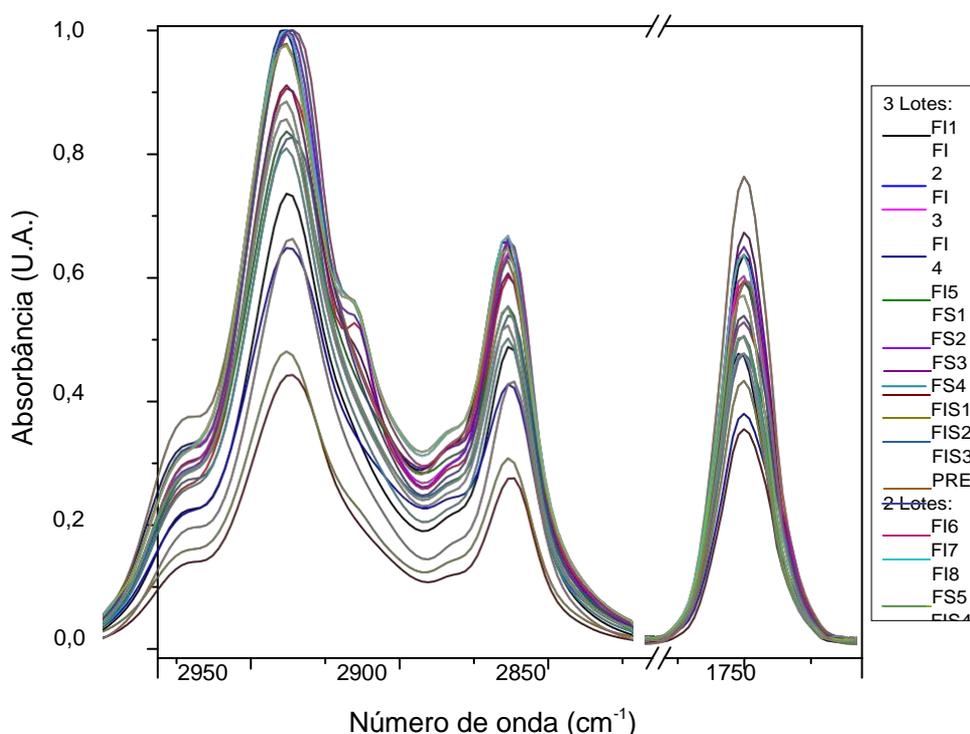


Figura 10- Espectros FT-MIR-ATR das fórmulas infantis aproximados na região de absorção característica de lipídios.

Nota-se comportamentos em geral similares, porém com algumas distinções, especialmente de intensidade e formato nos espectros dessas regiões. Em relação à altura, a explicação pode ser relacionada ao teor de

lipídios em cada amostra, uma vez que, conforme os resultados físico-químicos, este teor variou de $3,2 \pm 0,1 \text{ g} \cdot 100\text{kcal}^{-1}$ a $5,7 \pm 0,3 \text{ g} \cdot 100\text{kcal}^{-1}$ nas amostras estudadas.

Já em relação às pequenas variações de formato, pode-se justificar em função da formulação particular de cada indústria, bem como devido à heterogeneidade em relação ao tipo de lipídio presente. Neste estudo, há amostras que apresentam gordura láctea adicionada, em diferentes proporções, de óleos de origem vegetal, como por exemplo óleo de girassol, coco e soja, e/ou de adição de ácidos graxos poliinsaturados (DHA, comumente denominado ômega 3 e ARA, também conhecido como ômega 6), de forma a adequar a fórmula às necessidades do lactente e em relação ao leite materno.

As amostras de fórmula infantil FI2, FI6 e FI7, bem como as de fórmula de segmento FS2 e FS5 apresentaram um ombro na região próxima a 2900 cm^{-1} . Conforme informações do rótulo e de acordo com PortalPed (2017), estas amostras possuem em comum uma formulação de base quase majoritariamente láctea, devido à presença de lactose como único carboidrato, proteínas exclusivamente oriundas do leite, e gordura desta origem, mesmo que em pequenas proporções.

A região próxima a 2900 cm^{-1} é comumente associada ao estiramento de ligações C-H sp_3 , comuns na cadeia carbônica de ácidos graxos e carboidratos (SKOOG, 2006). Stephani *et al.* (2017) estudaram a vida de prateleira de concentrado de proteína do soro em pó através da espectroscopia Raman. Geralmente, os concentrados de proteína do soro contêm baixíssimos níveis de gordura, entretanto, os níveis de carboidratos são consideráveis. Os autores verificaram alterações na região de 2900 cm^{-1} e relacionaram com o estado cristalino da lactose presente em suas amostras. Sendo o concentrado de proteína do soro obtido de maneira similar ao leite em pó presente nas amostras aqui apresentadas, o mesmo pode estar ocorrendo aqui. Durante o processo de secagem/concentração do leite, ocorre a cristalização de açúcares e, com o tempo de armazenamento, novas bandas podem aparecer devido à diminuição da desordem das interações intermoleculares. À medida que ocorre a cristalização, ocorre um aumento na ordenação destas interações

intermoleculares e novas redes moleculares são formadas (STEPHANI *et al.*, 2017).

Silvestre *et al.* (2014) caracterizou lipídios em leite humano por meio de picos em 1754 cm^{-1} e 2857 cm^{-1} . Ao comparar os valores encontrados analisador MIR com o método físico-químico tradicional (método de Gerber), apesar das variações, uma boa correlação entre os dados foi observada, sugerindo que as diferenças entre os métodos poderiam ser evitadas reajustando a calibração do autoanalisador.

Bassbasi *et al.* (2014) caracterizaram lipídios em leite cru a partir da região de vibrações assimétricas em 2955 cm^{-1} e 2925 cm^{-1} , e das ligações CH em 2854 cm^{-1} . O pico em 1746 cm^{-1} foram relacionados à interação da radiação MIR com grupos C=O das funções éster presentes dos triglicerídeos do leite (triglicerídeos) e também, em menor grau, a interação com os grupos carbonila de ácidos carboxílicos e proteínas.

A região de 3000 cm^{-1} a 2780 cm^{-1} e de 1820 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} foi submetida a análise de componentes principais, resultando em dois componentes principais explicando cerca de 88% da variabilidade dos dados (Figura 11).

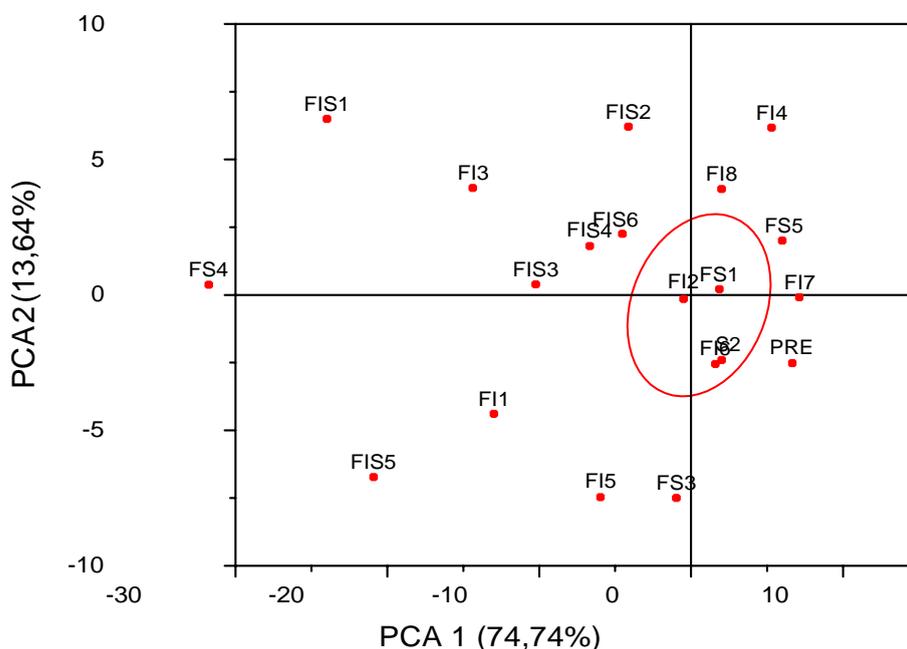


Figura 11 - Análise de componentes principais dos espectros das amostras avaliadas na região MIR característica de lipídios (3000 cm^{-1} a 2780 cm^{-1} e de 1820 cm^{-1} a 1700 cm^{-1})

Devido a grande similaridade entre os espectros, uma distribuição relativamente homogênea foi observada. Os pesos de cada variável sobre as amostras foram muito pequenos em relação ao PC1 que explica a maior variabilidade dos dados. Por outro lado, os pesos são mais significativos no PC2. Assim, a distribuição das amostras no plano PC1xPC2, tem maior influência devido aos pesos sobre o PC2.

Em relação ao PC1 a amostra FS4 foi a que menos se correlacionou com a maioria. Como exposto anteriormente, esta amostra não possui base láctea e contém óleos vegetais adicionados de DHA e ARA.

Pode-se observar que o grupo de amostras relacionadas com o ombro observado no espectro em 2900 cm^{-1} (Figura 10) foi agrupado em relação ao PC1, validando as observações espectrais.

5.2.2 Região MIR característica de proteínas

Avaliando-se a região dos espectros associada à absorção de proteínas (**Figura 12**), que neste estudo apresentou picos em torno de 1645 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} , observou-se, mais uma vez, um comportamento, em geral, similar entre as amostras, porém três delas (FIS3, PRE, FIS5) apresentaram particularidades.

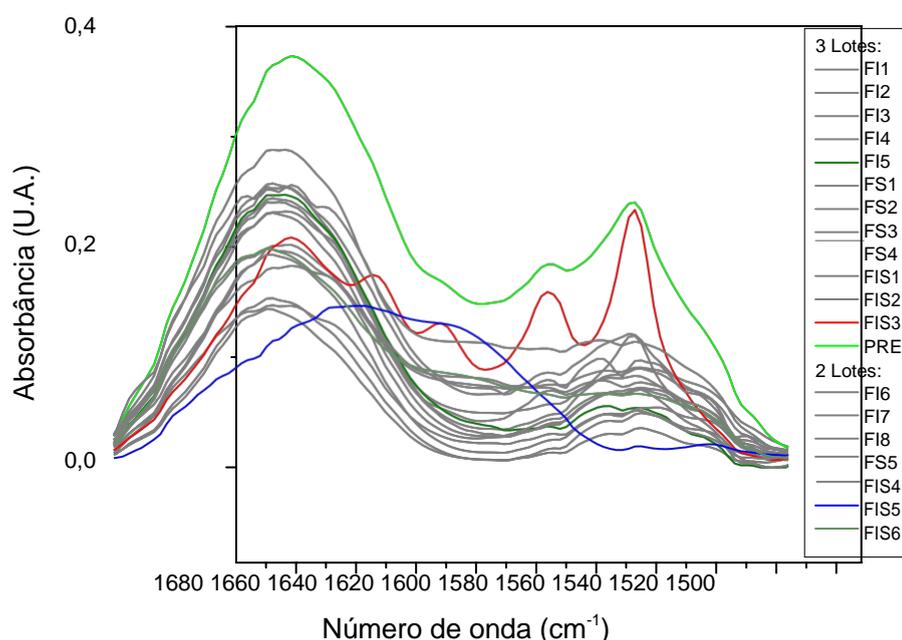


Figura 12- Espectros FT-MIR das fórmulas infantis aproximados na região de absorção característica de proteínas (1700 cm^{-1} a 1510 cm^{-1})

Ao relacionar o comportamento observado no espectro das amostras destacadas com as informações dos rótulos, vê-se que estas possuem certas singularidades, as quais podem ser utilizadas para explicar tais comportamentos. A amostra codificada como PRE possui recomendação de uso para recém-nascidos prematuros ou com baixo peso, e conforme a demanda nutricional deste grupo de lactentes, apresenta maior teor protéico, sendo composta por 70% soroproteínas e 30% de caseínas (PortalPed 2017). Além disso, há adição de nucleotídeos, cuja estrutura apresenta grupos nitrogenados, e por isso, podem ter absorvido nesta região. Estas informações corroboram com o maior teor protéico encontrado nas análises físico-químicas de composição, e assim podem explicar a maior área sob a curva e intensidade dos picos de Amida I e Amida II, quando comparada com as outras amostras avaliadas. Além disso, na região de Amida II, apresentou um ombro em 1564 cm^{-1} .

Segundo PortalPed (2017), a amostra FIS3 apresenta a fração proteica dividida em 60% de soroproteínas e 40% de caseínas, além da adição de nucleotídeos. Uma característica importante a ser salientada é a ausência de

lactose, sendo a maltodextrina o carboidrato presente. FIS3 apresentou um espectro bastante irregular, nesta faixa de números de onda, e, assim como PRE, também apresentou o ombro característico em 1564 cm^{-1} . Apesar de outras amostras também apresentarem esta composição, pode-se sugerir que a presença da maltodextrina, em combinação aos outros constituintes dessa amostra pode ter sido a responsável pela variação observada.

Estas amostras (PRE e FIS3) apresentaram um ombro na área de Amida II, com máximo em 1564 cm^{-1} . Neste ponto, comumente há associação de vibrações relacionadas com pares de estiramento C=O e C=C de compostos nitrogenados (IVANOVA e KOLEV, 2011).

A amostra FIS5 não apresentou os dois picos característicos de Amida I e II, mas apenas o de Amida I, com máximo deslocado de 1645 cm^{-1} para 1630 cm^{-1} . Este deslocamento está relacionado ao estiramento C=O de grupamentos amida (SMITH, 1998). Esta amostra é a única composta por proteínas lácteas extensamente hidrolisadas, dentro do universo amostral escolhido. De acordo com PortalPed (2017) sua fração proteica é representada pela presença de aminoácidos livres e peptídeos de baixo peso molecular, devido a sua alegação de hipoalergenicidade.

Casadio *et al.* (2010) e Silvestre *et al.* (2014) corroboram com a região utilizada neste estudo para caracterizar proteínas, uma vez que utilizaram a banda característica de amida na região de 1538 cm^{-1} para caracterização de proteínas em leite humano. Verificou-se que, em média, que o analisador MIR utilizado em ambos os estudos ofereceu valores de proteína mais elevados do que os obtidos analiticamente, o que foi explicado pela utilização de cálculos baseados em leite bovino, que tem concentração e qualidade proteica diferente do leite humano.

A mesma região utilizada neste estudo também foi escolhida por Solís-Oba *et al.* (2011) para a quantificação proteínas em processos de ultra e nanofiltração, de modo a monitorar tais operações, e também por Voort (1987) para avaliar a atividade proteolítica em leite cru mediante ao armazenamento do mesmo.

Azarias (2017) utilizou a espectroscopia FT-MIR-ATR para avaliar e acompanhar o índice de maturação de queijos Pecorino, Maturado e Gouda, produzidos com leite de ovelha. Foram observados picos característicos de

grupamento amida (1640 cm^{-1} e 1550 cm^{-1}) e picos referentes à presença de lipídeos (2922 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} e 1161 cm^{-1}), sendo que, de uma maneira geral, os valores das absorvâncias diminuíram com o passar do tempo de maturação, devido às atividades proteolíticas e lipolíticas decorrentes desse processo.

Andrade *et al.* (2018) utilizaram a espectroscopia MIR para caracterizar e detectar adulteração de concentrado de proteínas do soro de leite pela adição de soro de leite em pó. As bandas de amida I e II, com picos em 1640 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} respectivamente, apresentaram tendência decrescente com forte correlação com o teor de proteínas das amostras, e por isso, constatou-se a possibilidade de associação da espectroscopia FT-MIR-ATR com ferramentas multivariadas (PCA e PLS) para prever o teor proteico neste tipo de matriz.

Efetuuou-se a análise dos componentes principais (PCA) com o objetivo de avaliar esta região espectral (Figura 123 e Figura 14). PC1 e PC2 explicaram aproximadamente 89,5% da variabilidade dos espectros no intervalo de número de onda relacionado às proteínas. Pode-se observar que a maioria das amostras se correlaciona entre si, entretanto, FIS5, FIS3 e PRE bastante destacadas das demais, confirmando a análise espectral anterior.

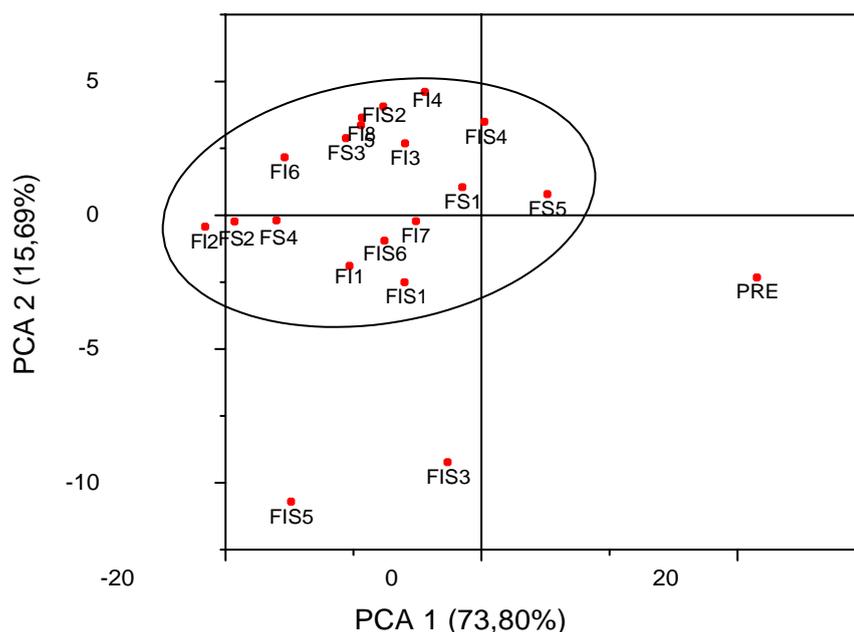


Figura 13- Score plot da análise dos componentes principais dos dados de FT-MIR na região característica de absorção das proteínas.

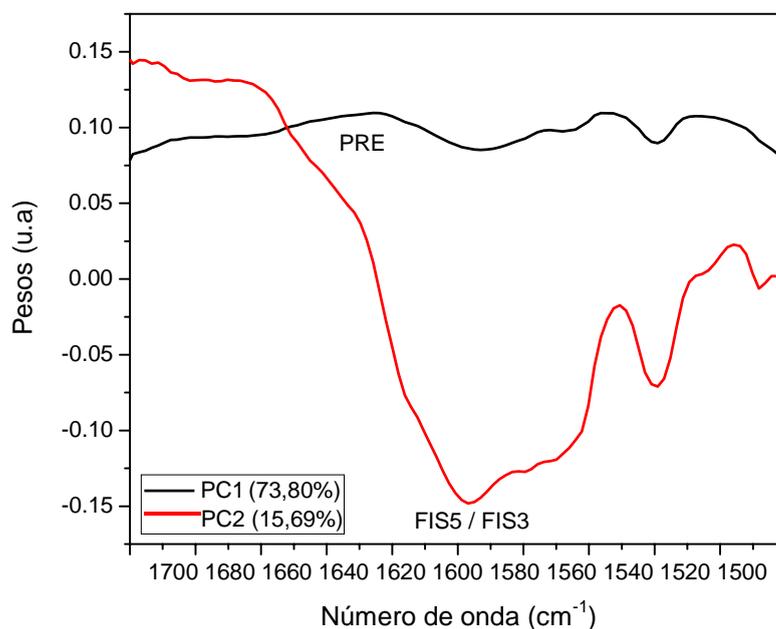


Figura 14 – Loading plot – Influência de cada variável nas amostras testadas

A Figura 14 mostra a influência de cada número de onda no posicionamento das amostras no novo plano de eixos principais 1 e 2. Apesar do PC1 ser responsável por aproximadamente 74% da variabilidade dos dados, os pesos são muito inferiores em relação ao PC2. Dessa forma, o PC2 é mais significativo na distribuição das amostras, ou seja, possui maior responsabilidade na separação das amostras menos semelhantes (PRE, FIS5 e FIS3), com destaque para a região entre 1630 cm^{-1} a 1560 cm^{-1} , validando a observação espectral.

5.2.3 Região MIR característica de carboidratos

Ao avaliar o intervalo de absorção característico dos carboidratos, encontra-se uma região de difícil compreensão do comportamento espectral (Figura 15). Segundo Barbosa (2007) a região entre 1300 cm^{-1} a 900 cm^{-1} é geralmente muito complexa e por isso, as vezes não analisada, contendo muitas bandas referentes ao esqueleto carbônico das moléculas. Além disso, é

uma faixa considerada como -impressão digital, uma vez que pode servir para confirmar a identidade de determinados composto, pois mesmo compostos isômeros, que apresentam espectros iguais em outras regiões apresentarão diferenças nestes números de ondas. Destacam-se nesta região as absorções de estiramento de C-O de álcoois, éteres e ésteres. No caso de éteres cíclicos, como os carboidratos em questão, é comum bandas em torno de 1270 cm^{-1} a 1030 cm^{-1} , região que será adotada para caracterizá-los.

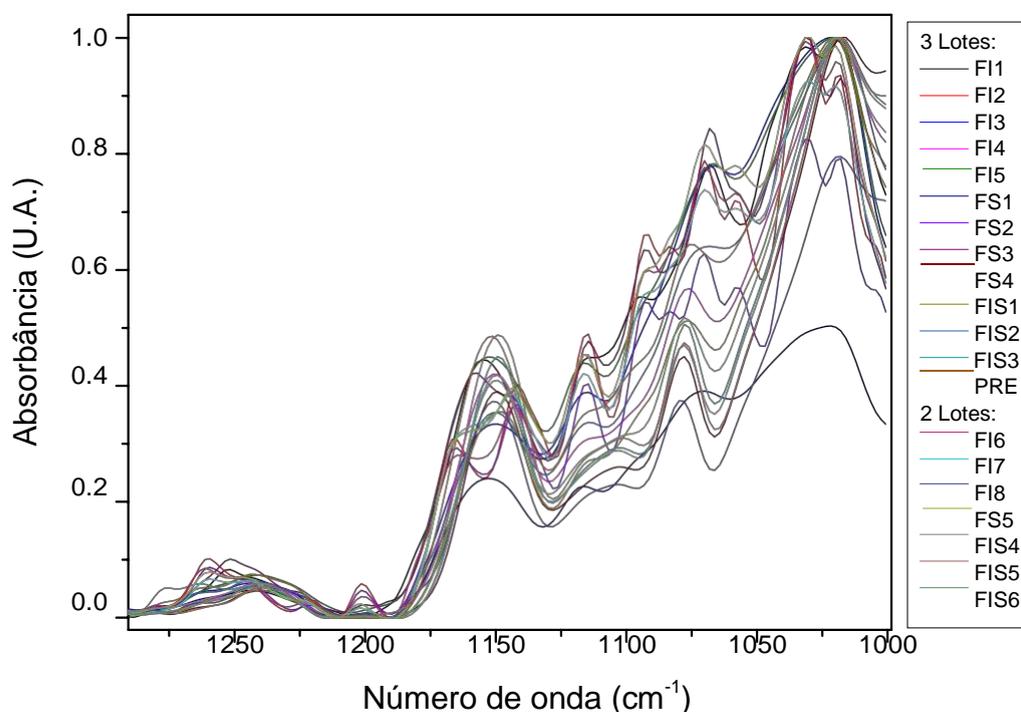


Figura 15- Espectros FT-MIR das fórmulas infantis aproximados na região de absorção característica de carboidratos

As amostras apresentaram alguns perfis distintos. Na maioria dos casos, os principais picos e bandas estiveram presentes em 1250 cm^{-1} (estiramento C-O sp^2), 1150 cm^{-1} (estiramento C-O), 1115 cm^{-1} (estiramento C=O), 1070 cm^{-1} (estiramento assimétrico C-O-C) e 1020 cm^{-1} (estiramento C-O de ésteres) (SHARMA, 2007). Porém algumas amostras revelaram ombros e picos em outras áreas. Amostras de fórmulas de segmento FS2, FS3 e FS5 e fórmulas infantis FI2, FI6 e FI7 demonstraram picos específicos em 1200 cm^{-1} e 1030

cm^{-1} , além de ombros em 1060 cm^{-1} e 1080 cm^{-1} (ambas estiramento -OH, comum em lactose) (SKOOG, 2006), o que não ocorreu com as demais amostras. De maneira similar, todas estas amostras, exceto FS3, revelaram um pico em 1166 cm^{-1} e outro em 1140 cm^{-1} . Já o restante das amostras, incluindo FS3, nesta região revelaram apenas um pico em 1150 cm^{-1} .

Estas nuances entre os espectros dificultaram a análise e caracterização do conjunto de dados. Assim, foi realizada uma análise dos componentes principais, com a finalidade de auxiliar e simplificar a interpretação dos dados. Os três primeiros componentes principais explicaram aproximadamente 87,5% da variabilidade dos dados submetidos a análise. A Figura 16 destaca o posicionamento das amostras (*score plot*) em relação aos três primeiros PCs.

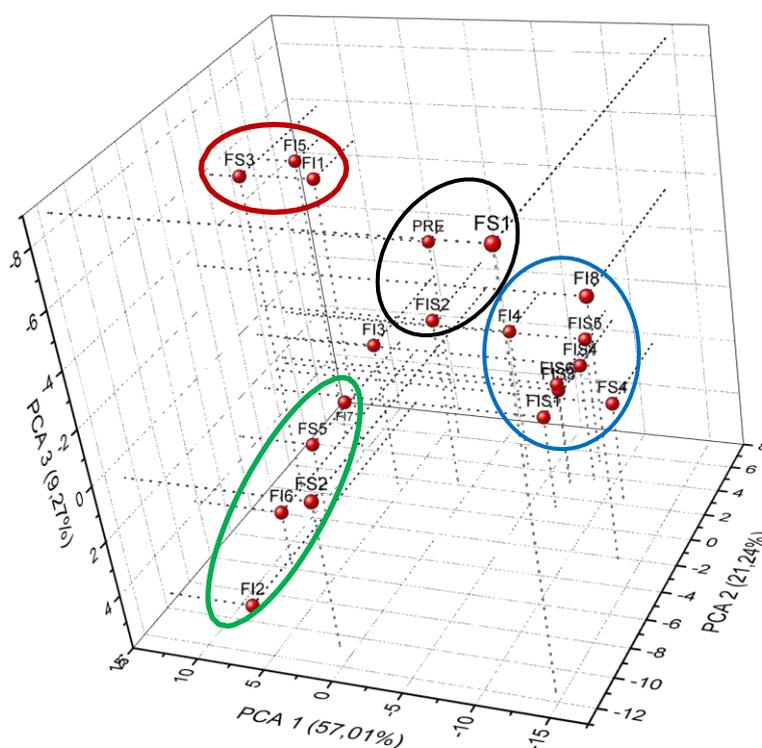


Figura 16 - Análise dos componentes principais, em três dimensões, dos dados de FT-MIR na região característica de absorção dos carboidratos.

Houve uma distinta separação das amostras e a formação de grupos característicos. Ao relacionar a PCA com os dados dos rótulos das amostras, observou-se que a natureza e/ou a quantidade de carboidratos presente foram utilizados para agrupar as amostras. O grupo destacado em azul na Figura 16 corresponde a amostras que não possuem lactose em sua composição, sendo

compostas exclusivamente de maltodextrina ou tendo este carboidrato associado a amido ou polímeros de glicose. Já o grupo central (destacado em preto) é composto por amostras cuja composição é intermediária em relação aos demais, por apresentar majoritariamente lactose adicionada de maltodextrina, de acordo com a formulação desenvolvida pela indústria. Os grupos destacados em verde e vermelho possuem exclusivamente a lactose como carboidrato. O grupo em verde, contendo as amostras FI2, FI6, FI7, FS2 e FS5 revelou picos e ombros característicos, como descritos anteriormente.

Casadio *et al.* (2010) e Silvestre *et al.* (2014) utilizaram a região de 1042cm^{-1} (grupo OH) para a caracterização de lactose em leite humano e obtiveram valores semelhantes aos esperados para este tipo de matriz alimentar. Além disso, destacaram como vantagens a caracterização de outros açúcares redutores tais como oligossacarídeos, que podem estar presentes em quantidades grandes e variáveis em leite humano.

Solís-Oba *et al.* (2011) utilizaram picos em 1075cm^{-1} e 1042cm^{-1} para caracterizar e quantificar lactose em soro concentrado por ultra e nanofiltração, concluindo a eficácia da espectroscopia FT-MIR em tal monitoramento, de forma rápida e precisa.

Andrade *et al.* (2018) ao estudar a adulteração de concentrado proteico por adição de soro de leite em pó, observaram uma diferenciação na forma de espectro em torno da banda de carboidrato (estiramento OH), em 1080cm^{-1} , a partir de uma adição de 20% de soro ao concentrado proteico. Em amostras com predominância de soro em pó, os valores de intensidade de absorção da banda de OH foram semelhantes ou superiores às suas bandas de amida, devido ao alto teor de lactose presente.

A análise de componentes principais auxilia na classificação das diferentes fórmulas utilizadas neste trabalho e valida as informações espectrais. As nuances observadas nos espectros e validadas pela análise de componentes principais podem ser significativas no planejamento de um modelo matemático para a quantificação dos constituintes. Assim, devido à grande variabilidade apresentada pelas amostras aqui estudadas, para um possível uso da espectroscopia na previsão quantitativa dos constituintes, talvez sejam necessárias diferentes curvas de calibração para cada tipo de formulação.

5.3 Predição de valores físico-químicos a partir dos espectros FT-MIR

A partir dos dados espectrais e dos valores de composição obtidos pelos métodos oficiais de análise, realizou-se a Regressão por Mínimos Quadrados (do inglês *PLS*), no qual a região adotada para a interpretação dos espectros (3000 cm^{-1} a 2815 cm^{-1} e 1780 cm^{-1} a 1000 cm^{-1}) foi usada como matriz X (variável dependente) e os teores obtidos analiticamente, como matriz Y (variável independente). Foram utilizadas 13 marcas (aquelas que possuem três lotes de amostras) para compor a etapa de calibração dos dados, e as outras 7 marcas (que possuíam dois lotes de amostras) foram utilizadas na validação do método.

Esta análise estatística tem por objetivo verificar correlações entre estas matrizes, dando pesos às colunas da matriz X (dados MIR), de acordo com sua influência no modelo de predição. Para cada teor físico-químico, o modelo prediz um resultado, baseado na correlação entre os espectros e a coluna específica da medida na matriz Y (lipídios, proteínas, carboidratos, por exemplo). Ao relacionar as matrizes X e Y, observou-se que, dentre os números de onda importantes na construção do modelo matemático de predição, a região entre 1400 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} foi aquela de maior peso (simbolizada pela maior altura em relação ao eixo y), ou seja, foi a de maior influência no modelo (Figura 17).

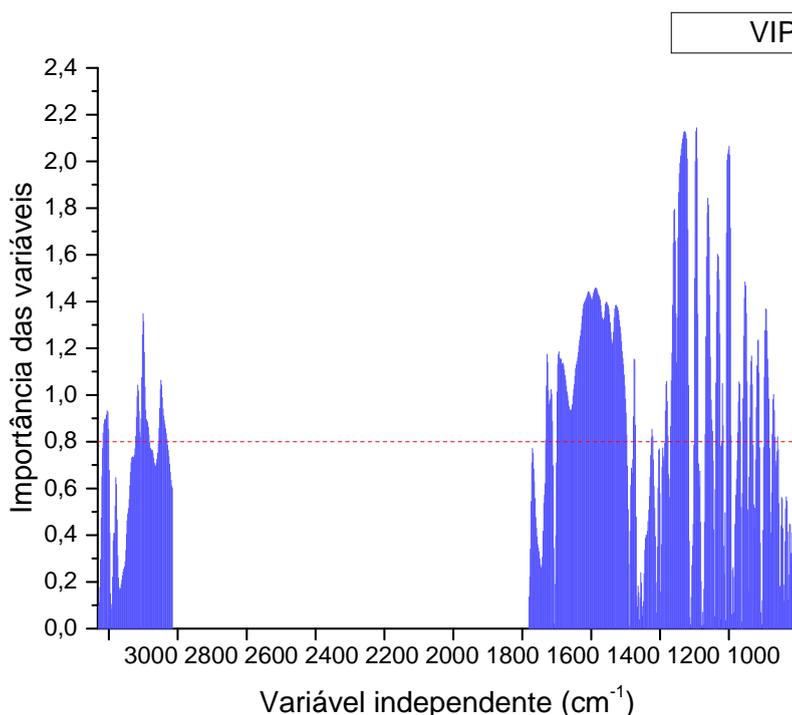


Figura 17 – Gráfico de pesos da matriz X (dados MIR) em relação ao modelo de predição

Conforme já abordado anteriormente, esta região espectral está relacionada, principalmente, à absorção de carboidratos, sendo a região do espectro que possui as maiores diferenças entre as amostras. Para as outras regiões, foram relacionados baixos pesos uma vez que o modelo não encontrou correlação entre os dados MIR e os dados físico-químicos, como ocorre quando se planeja uma curva de padrões analíticos. Isto pode ser explicado devido à grande variação encontrada nos espectros, que nem sempre foi acompanhada por uma diferença tão significativa nos teores físico-químicos. Assim, o modelo utilizou a região de absorção dos carboidratos para prever todos os outros atributos (proteínas, lipídios, umidade, sólidos totais e cinzas), pois considerou ser a região de maior correlação entre os dados.

Durante a calibração do método, utilizando-se da validação cruzada e o modelo com um fator ou variável latente foi o que apresentou os melhores resultados de previsão.

Os resultados da calibração e validação são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Coeficientes obtidos relacionando matriz X e Y no PLS

Medida	Calibração n = 13			Validação n = 7		
	R ²	RMSE	RE(%)	R ²	RMSE	RE(%)
Lipídios	0,383	0,577	12,70	0,759	0,411	8,60
Proteínas	0,040	2,398	111,70	0,176	2,577	133,10
Carboidratos	0,586	0,491	4,30	0,642	0,459	3,90
Cinzas	0,109	1,193	33,80	0,008	1,805	57,60
Sólidos Totais	0,260	91,198	95,30	0,111	92,005	95,40
Umidade	0,271	0,607	13,90	0,113	1,190	32,90

Conforme já descrito anteriormente R^2 é o coeficiente de determinação, relacionado com o ajuste de um modelo linear, neste caso, a relação entre os valores reais, obtidos quimicamente para as análises físico-químicas, e os preditos pelo modelo. Quanto mais próximo de 1, melhor. Visualmente, quanto mais sobreposta for a reta de ajuste linear do conjunto de dados de calibração sobre a do conjunto de validação, menor o erro de predição do método. Logo, observa-se que o modelo PLS ofereceu resultados ruins para o ajuste linear (Tabela 14 e Figura 18). Neste sentido, vê-se que os melhores resultados foram obtidos em relação ao teor de carboidratos.

Em relação aos resíduos, ou seja, a diferença entre cada valor real e o predito pelo modelo, é desejável que sejam mínimos, indicando menor erro de predição (Figura 19).

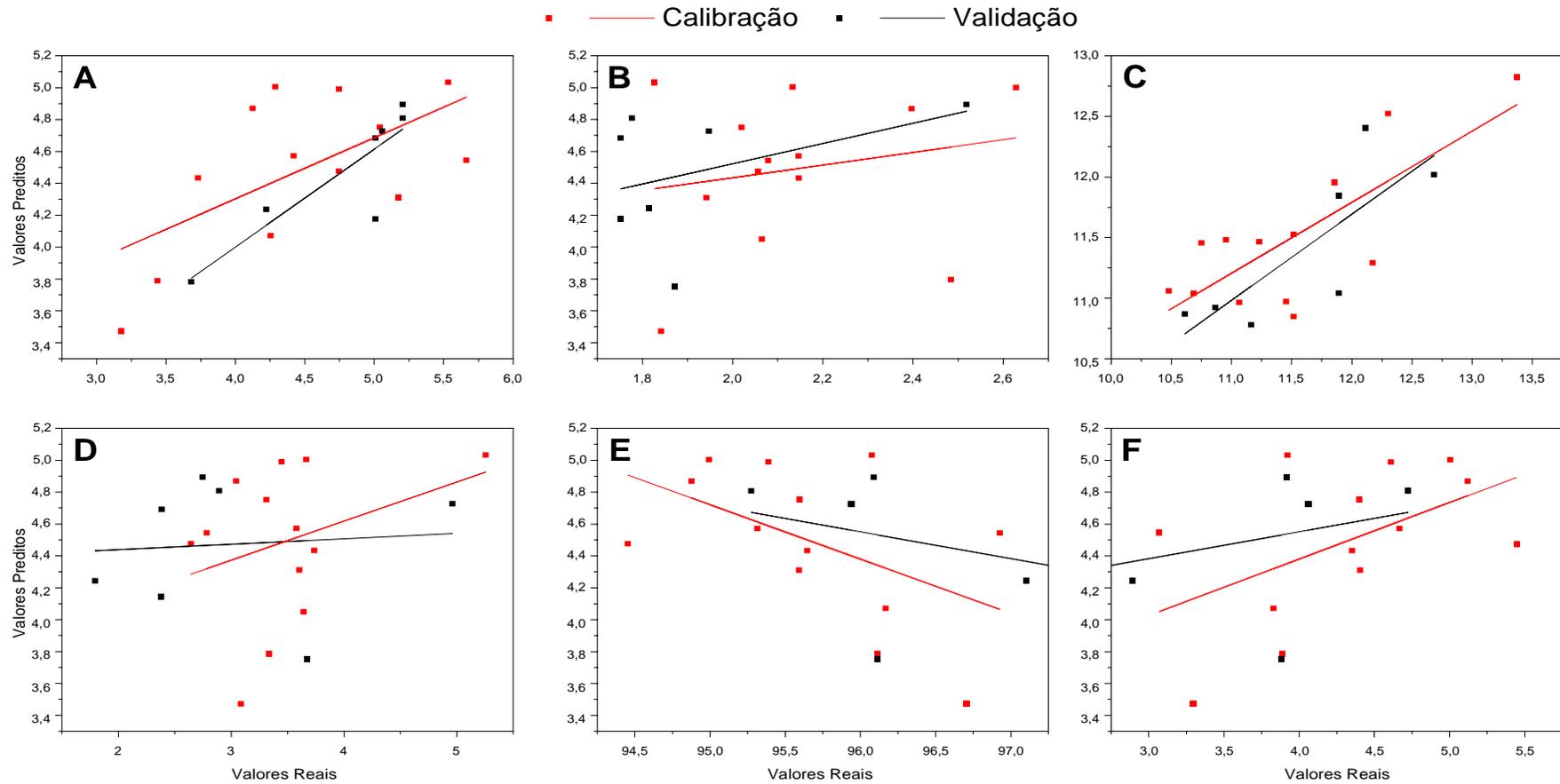


Figura 18 – Calibração e predições para validação do modelo PLS para os atributos: em $\text{g}\cdot 100\text{kcal}^{-1}$ (A) lipídios; (B) proteínas; (C) carboidratos; (D) cinzas; em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (E) sólidos totais; (F) umidade

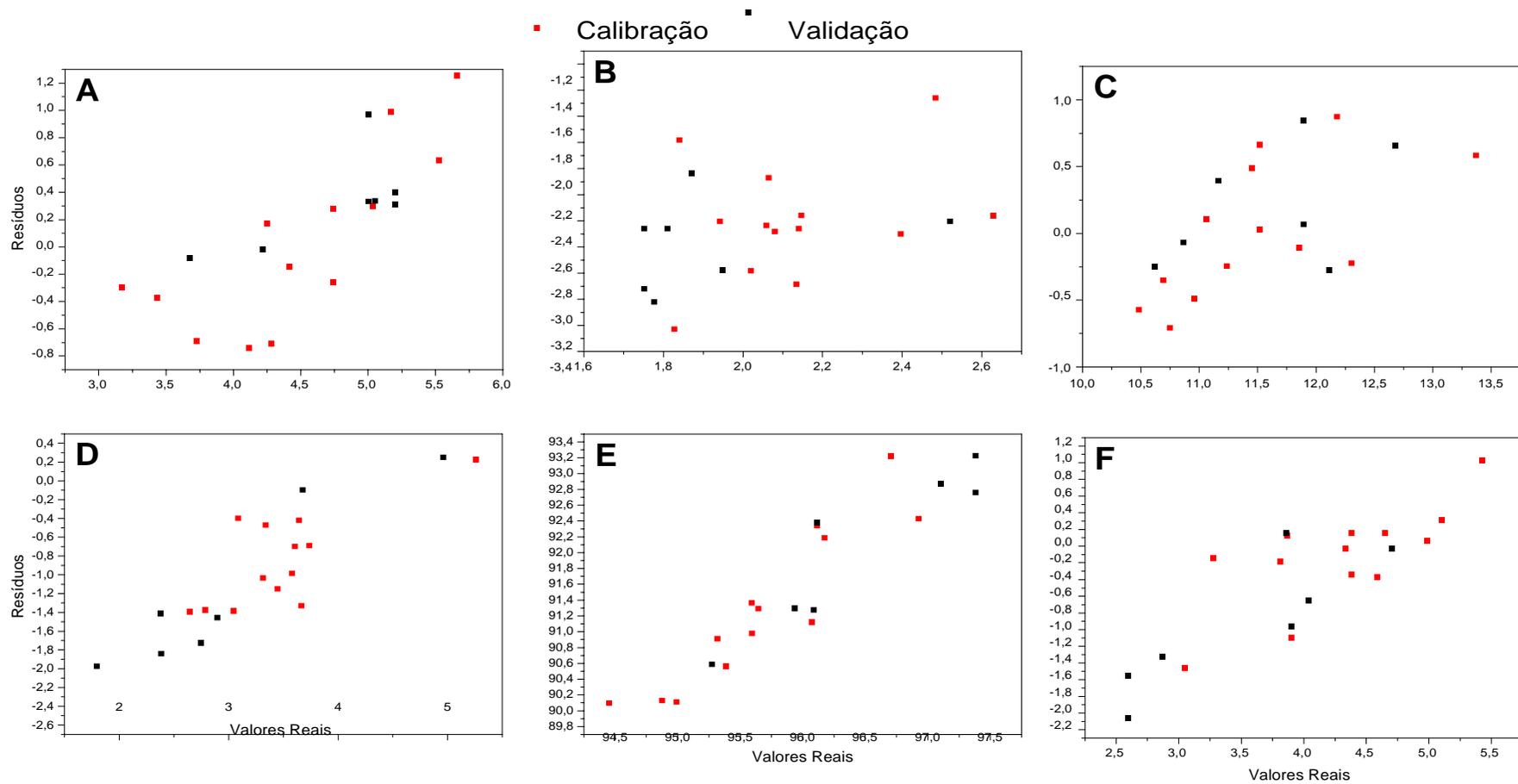


Figura 19: Estimativa de erro de previsão para os conjuntos de dados de calibração e validação do modelo PLS para os atributos: em $\text{g}\cdot 100\text{kcal}^{-1}$ (A) lipídios; (B) proteínas; (C) carboidratos; (D) cinzas; em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (E) sólidos totais; (F) umidade

Em vários casos a distribuição aleatória dos resíduos não foi observada, indicando tendências de aumento nos erros a medida que os valores reais se tornam maiores. Os resíduos obtidos nos teores de sólidos totais são muito altos, confirmando que o modelo não pode ser utilizado para a predição deste parâmetro. A distribuição dos resíduos foi homocedástica apenas nos parâmetros de proteínas e carboidratos.

Os valores de RMSE e RE calculados (Tabela 14), representam uma análise geral do modelo preditivo, sendo o RMSE representa o desvio padrão geral dos erros de previsão e o erro relativo a variação geral do modelo, onde quanto menores estes valores, melhor será o modelo (MORGANO *et al.*, 2005). Ao avaliar os resíduos, o RMSE e o RE, observa-se que todos os atributos oferecem resíduos altos, com exceção dos teores de carboidratos, mostrando baixos erros de previsão.

Uma vez que a região de 1400 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} foi utilizada para prever os valores dos outros atributos, a correlação destas outras medidas (proteínas, lipídios, cinzas, sólidos totais e umidade) com intervalo de número de onda selecionado é inexistente, gerando, portanto, um modelo ruim para predição destes dados; além disso, não ocorreu um perfil de curva de calibração. Em contrapartida, esta mesma região do espectro (região com predomínio de grupamentos químicos provenientes a carboidratos), foi a que apresentou melhor correlação e menores erros de predição para o teor de açúcares, ou seja, mostrou alguma semelhança a uma curva de calibração.

Dessa forma, os melhores resultados obtidos foram nas previsões de carboidratos, uma vez que os dados reais e preditos estão moderadamente correlacionados, conforme ilustrado na Tabela 15. Além disso, apesar do coeficiente de determinação nos carboidratos ser por volta de 0,6 tanto na calibração quanto na validação, os valores de RMSE e RE são baixos, indicando que o modelo pode vir a ser bom, caso haja uma curva de calibração de carboidratos associada a esta medida.

Tabela 15 – Dados reais, preditos e erros para a predição do teor de carboidratos das amostras testadas

	Valores analíticos (g/100kcal)	Valores preditos (g/100kcal)	Resíduos (g/100kcal)
FI1	11,23183	11,46249	0,23066
FI2	13,37525	12,816	-0,55925
FI3	10,7518	11,45482	0,70302
FI4	11,4558	10,97023	-0,48557
FI5	10,95547	11,48053	0,52506
FS1	11,51866	11,52486	0,0062
FS2	12,30386	12,52022	0,21636
FS3	11,85658	11,95441	0,09783
FS4	11,51866	10,84577	-0,67289
FIS1	10,48068	11,05743	0,57675
FIS2	12,17682	11,29019	-0,88663
FIS3	11,0668	10,96372	-0,10308
PRE	10,68697	11,03851	0,35154
FI6	12,11395	12,39951	-0.28556
FI7	11,89391	11,84195	0.05196
FI8	11,89391	11,03988	0.85403
FS5	12,68566	12,01848	0.66718
FIS4	10,61493	10,86816	-0.25323
FIS5	11,16601	10,77909	0.38692
FIS6	10,8664	10,92081	-0.05441

Portanto, apesar dos resultados encontrados, o modelo é promissor principalmente para a determinação de carboidratos nas amostras de fórmulas infantis testadas. Quando realizada uma curva de calibração para cada medida, o modelo pode vir a ser ajustado às outras medidas, de forma a melhorar a correlação e reduzir o erro entre dados reais e preditos pela ferramenta utilizada.

6 CONCLUSÃO

Dentre as formulas infantis estudadas, foi observada uma grande variação em relação às formulações, principalmente entre as diferentes categorias, destacando-se aquelas indicadas para lactentes sob dietas específicas.

Observou-se que a determinação da composição pelos métodos físico-químicos de referência demandam grande tempo e pessoal capacitados, uma vez que cada atributo é determinado por uma metodologia diferente, com grande gastos de reagentes químicos e produção de resíduos. Ao avaliar as amostras testadas frente aos métodos tradicionais, viu-se que em geral, que estas atendem à legislação vigente em relação aos componentes majoritários.

O método proposto, por meio da utilização da espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier e refletância total atenuada (FT-MIR-ATR), atingiu com sucesso o objetivo de caracterizar a composição de Fórmulas Infantis, uma vez que ofereceu espectros com picos associados à absorção dos principais componentes das amostras. Além disso, tem como principais vantagens a determinação simultânea de vários atributos em uma única avaliação da amostra, em poucos minutos, exigindo um pré-tratamento da amostra mínimo, sem gastos de reagentes e produção de resíduos.

Ao mesmo tempo, aliando a espectroscopia FT-MIR à Análise por Componentes Principais (PCA), foi possível discriminá-las em grupos, que podem ser explicados pelas alegações presentes nos rótulos e reforçados pelos dados físico-químicos obtidos por métodos oficiais.

Já em relação à proposta de predição de dados físico-químicos a partir dos espectros FT-MIR, o modelo construído pelo PLS não encontrou boa correlação entre as matrizes, sendo os melhores resultados relacionados à região típica da absorção de carboidratos (1400 cm^{-1} a 1000 cm^{-1}).

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com o estudo realizado, foi possível perceber que, em função da grande variabilidade composicional entre as fórmulas infantis testadas, somente a previsão para teor de carboidratos ofereceu erros mais baixos e melhor correlação, dando ao modelo um potencial promissor principalmente para a quantificação deste componente. Portanto, sugere-se o desenvolvimento de curvas de calibração neste tipo de amostra, objetivando tornar possível a aplicação do método para a predição dos demais atributos físico-químicos.

A partir disso, vê-se grande potencial ao aliar a espectroscopia no infravermelho e ferramentas multivariadas como uma ferramenta rápida e segura para atuar no controle de qualidade de alimentos, principalmente em matrizes complexas.

8 REFERÊNCIAS

- 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 Perguntas e Respostas sobre Rotulagem de Alimentos Alergênicos. , 2015.
- ANDRADE, J. *et al.* FTIR- ATR determination of protein content combined with chemometric approaches to attest Whey Protein Concentrate (WPC) authenticity. Manuscrito sob revisão aos pares. 2018
- AZARIAS, Cosme Antonio. UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PARA DETERMINAÇÃO RÁPIDA DO ÍNDICE DE MATURAÇÃO EM QUEIJOS PECORINO, MATURADO E GOUDA FABRICADOS COM LEITE DE OVELHA.** Universidade Federal de Juiz de Fora, 2017. 103 p.
- BALABIN, Roman M.; SMIRNOV, Sergey V. Melamine detection by mid- and near-infrared (MIR/NIR) spectroscopy: A quick and sensitive method for dairy products analysis including liquid milk, infant formula, and milk powder. **Talanta** v. 85, n. 1, p. 562–568 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.026>>.1873-3573 (Electronic)r0039-9140 (Linking).
- BARBOSA, Luiz Cláudio de Almeida. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos.** 1ª edição. Viçosa: Editora UFV. 2007
- BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1767, p. 1073–1101 , 2007.
- BASSBASI, M., PLATIKANOV, S., TAULER, R., & OUSSAMA, A. FTIR-ATR determination of solid non fat (SNF) in raw milk using PLS and SVM chemometric methods. **Food Chemistry**, 146, 250–254. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.044>. 2014
- BORTOLINI, Gisele Ane *et al.* Early cow's milk consumption among Brazilian children: results of a national survey. **Jornal de pediatria** v. 89, n. 6, p. 608–13 , 2013.
- BRASIL. *Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 43, DE 19 DE SETEMBRO DE 2011. (Alterada pela Resolução – RDC nº 46, de 25 de setembro de 2014.)* . ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: [s.n.] , 2011a
- BRASIL. *Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 44, de 19 de setembro de 2011* . ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: [s.n.] , 2011b
- BRASIL. *Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 45, de 19 de setembro de 2011.* . ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: [s.n.] , 2011c
- BRUKER OPTICS. *Introduction to FT-IR spectroscopy - OPUS Spectroscopic Software* . [S.l.]: Bruker Optik GmbH. , 2014
- CALIL, Valdenise Martins Laurindo Tima; FALCÃO, Mário Cícero. Composição

do leite humano: o alimento ideal Human milk composition: the ideal nutrition for infants. **Pediatria** v. 82, n. 1, p. 1–10 , 2003.

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.

CAMPOS, Lucio de Albuquerque *et al.* Fórmulas para Lactentes: repercussões na qualidade da nutrição e saúde infantil. **RevPediatr** v. 9, n. 2, p. 59–65 , 2008.

CASADIO, Ylenia S *et al.* Evaluation of a Mid-Infrared Analyzer for the Determination of the Macronutrient Composition of Human Milk. **J Hum Lact** v. 26, p. 376–383 , 2010.

CORKINS, Kelly Green; SHURLEY, Teresa. What ' s in the Bottle? A Review of Infant Formulas Functional Ingredients in Infant Formulas Standard Cow ' s Milk – Based Term Infant Formula. **Nutrition in Clinical Practice** v. Volume 31, p. 723 –729 , 2016.

DRUNKLER, Deisy A.; FARINA, Luciana O.; NETO, Georges Kaskantzis. Alergia ao leite de vaca e possíveis substitutos dietéticos. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes** n. 45, p. 3–16 , 2010.

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.

FAGAN, CC *et al.* Milk and Dairy Products. In: SUN, Da-Wen (Org.). . **Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control**. 1. ed. National University of Ireland, Dublin: Elsevier Inc., 2009. p. 241–267. 9780123741363.

FERRARINI, Hair. **Determinação de teores nutricionais do milho por Espectroscopia no Infravermelho e Calibração Multivariada**. Universidade Federal do Paraná, 2004.

FERREIRA, Isabel M. P. L. V. O. Composição do Leite de Mulher, do Leite de Vaca e das Fórmulas de Alimentação Infantil. **Acta Pediatr Port** p. 277–285 , 2005.

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724–731, 1999.

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.

IVANOVA B, KOLEV T. **Linearly Polarized IR Spectroscopy: Theory and Applications for Structural Analysis**. CRC Press. 2011. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=x2Cabv83pM4C&pg=PA147&lpg=PA147&dq=1564+cm-1&source=bl&ots=oTuyO9mGj_&sig=-QUS_nFo4ajjlonb54uFX_z9Umc&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjvxJ-xrTZAhVN6IMKHcp6DUUsQ6AEILzAB#v=onepage&q=1564%20cm-1&f=false
Acesso em: 15/02/2018

- LIN, Mengshi *et al.* Infrared (IR) Spectroscopy—Near- Infrared Spectroscopy and Mid-Infrared Spectroscopy. In: SUN, Da-We (Org.). . **Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control**. 1. ed. National University of Ireland, Dublin: Elsevier Inc., 2009. p. 119–143. 9780123741363.
- LÖNNERDAL, Bo. Bioactive Proteins in Human Milk: Health, Nutrition, and Implications for Infant Formulas. **The Journal of pediatrics** v. 173 Suppl, p. S4-9 , 1 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.jpeds.com/article/S0022347616002936/fulltext>>. Acesso em: 15 dez. 2016.
- LÖNNERDAL, Bo. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. **The American Journal of Clinical Nutrition** v. 99, p. 712–717 , 2014.
- LUTZ, Adolfo. Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos. **Instituto Adolf Lutz** p. 589–625 , 2008.
- MALDONATO, José *et al.* Special formulas in infant nutrition: a review. **Early Human Development** v. 3782, p. 23–32 , 1998.
- MENDES, T. de O. **Métodos multivariados para a elucidação de informações analíticas em amostras complexas**. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.
- MORGANO, M. A. *et al.* Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 25, n. 1, p. 25–31 , 2005.
- NUNES, Lauane *et al.* **CARACTERIZAÇÃO DE FÓRMULAS INFANTIS COMERCIAIS**. 31º Congresso Nacional de Laticínios. EPAMIG/ Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Juiz de Fora. MG: [s.n.], 2017.9781601197795.
- OLIVEIRA, Maria Carolina Pais Pinto De. **Espectrofotometria no Infravermelho- por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared): Validação na análise do teor de ureia e de outros parâmetros de qualidade do leite**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011. 70 p.
- OSBORNE, B. G.. **Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis**. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd. 2000
- OWENS, C J W; LABUSCHAGNE, I L; LOMBARD, M J. The basics of prescribing infant formulas. **South African Family Practice** v. 6190, n. January, p. 25–30 , 2017.
- PANIAGO, Evellyn de Oliveira *et al.* FÓRMULAS INFANTIS INDUSTRIALIZADAS: impacto na informação nutricional. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde** p. 537–548 , 2017.
- PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PEREIRA, Patricia Brasil; SILVA, Cristiane Pereira. Alergia a proteína do leite de vaca em crianças: repercussão da dieta de exclusão e dieta substitutiva sobre o estado nutricional. **Pediatria** v. 30, n. 2, p. 100–106 , 2008.
- PROTESTE. *Cartilha de Alergia Alimentar*. Disponível em: <http://poenorotulo.com.br/CartilhaAlergiaAlimentar_29AGO.pdf>. Acesso em: 17 maio 2015.

REA, Marina Ferreira. Substitutos do Leite Materno: passado e presente.

Revista de Saúde Pública p. 241–249 , 1990.

RENHE, Isis Rodrigues Toledo. *Intolerância e má-absorção de lactose*.

Disponível

em:

<http://api.ning.com/files/bdG71GPfFwG2d9Tesqi6Dv4WtgaPJE82PywS3N7m31d2MDD8*t190mTNETFJAcH*tFMwLRrLXnx1wcnb1qQzD4YtUKKu5Uit/ArtigoIsisTetraPak.pdf>. Acesso em: 14 maio 2015.

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.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; ALLENDORF, M.E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. **Annual Review of Food Science and Technology** v. 2, n. 1, p. 467–483 , 2011.1941-1413.

SABIN, JANUSA GOELZER; FERRAO, MARCO FLÔRES. **Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA**. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* [online]. 2004, vol.40, n.3, pp. 387-396. ISSN 1516-9332.

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.

SHARMA YR. **Elementary Organic Spectroscopy**. S. Chand Publishing. 2007.

Disponível

em:

https://books.google.com.br/books?id=aolrDAAAQBAJ&dq=1070+cm-1&hl=pt-BR&source=gbs_navlinks_s Acesso em: 20/02/2018

SILVA, Maurício Henriques Louzada. **Desenvolvimento e Caracterização de um Isolado Proteico de Soja Modificado com Perfil de Solubilidade da Caseína do Leite Humano**. Universidade Federal de Viçosa, 2007. 105 p.

SILVA, Roberta Claro Da *et al.* Composição Centesimal do Leite Humano e Caracterização das Propriedades Físico-Químicas de sua Gordura. **Quim Nova** v. 30, n. 7, p. 1535–1538 , 2007.

SILVESTRE, Dolores *et al.* Comparison of mid-infrared transmission spectroscopy with biochemical methods for the determination of macronutrients in human milk. **Maternal and Child Nutrition** v. 10, p. 373–382 , 2014.

SIMAS, R. C. **Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia de infravermelho próximo**. Universidade Estadual de Campinas, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.. **Principles of Instrumental Analysis**. 6th Ed. Thompson Brooks/Cole. 2006. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)84936-3](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)84936-3)

SMITH, B. **Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach**. CRC Press. 1998.

Disponível

em:

https://books.google.com.br/books?id=Ywzf4GyoUaoC&dq=1630+cm-1&hl=pt-BR&source=gbs_navlinks_s Acesso em 16/02/2018

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **Manual de Orientação para a alimentação do lactente, do pré-escolar, do escolar, do adolescente e na escola**. Terceira ed. Rio de Janeiro, RJ: Departamento de Nutrologia. SBP, 2012.

STEPHANI *et al.* Raman spectroscopy as a tool to identify modification of whey protein concentrate (WPC) during shelf life. **Food Packaging and Shelf Life**. vol11.2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.10.001> Acesso em: 20/01/2018

WALSTRA, Pieter; WOUTERS, Jan T. M.; GEURTS, Tom J. **Dairy Science and Technology**. 2nd. ed. [S.l: s.n.], 2006. .0-8247-0187-9.

WOLFSCHOON, Alan F. Análise do Leite por Espectroscopia Infravermelha - 2a parte. **Revista do ILCT** p. 3–9 , 1977.