

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

**Cintya Emerenciano Quirino**

**Adaptação do Método do Formol de Quantificação de Proteínas para Leite Humano**

Juiz de Fora

2022

**Cintya Emerenciano Quirino**

**Adaptação do Método do Formol de Quantificação de Proteínas para Leite Humano**

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

Orientadora: Prf. Dra. Denise Sobral

Coorientadora: Prf. Dra. Gisela de Magalhães Machado Moreira

Prf. Dra. Renata Golin Bueno Costa

Juiz de Fora  
2022

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

EMERENCIANO QUIRINO, CINTYA.

Adaptação do método do formol de quantificação de proteínas para leite humano / CINTYA EMERENCIANO QUIRINO. -- 2022.

51 f. : il.

Orientadora: Denise Sobral

Coorientadoras: Gisela de Magalhães Machado Moreira, Renata Golin Bueno Costa

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, 2022.

1. Banco de Leite Humano. 2. Kjeldahl. 3. Nutrientes. I. Sobral, Denise, orient. II. de Magalhães Machado Moreira, Gisela, coorient. III. Golin Bueno Costa, Renata, coorient. IV. Título.

Cintya Emerenciano Quirino

**Adaptação do método do formol de quantificação de proteínas para leite humano**

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

Aprovada em 05 de setembro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Denise Sobral - Orientadora**  
**EPAMIG/ILCT**

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

**Profa. Dra. Renata Golin Bueno Costa - Coorientadora**  
**EPAMIG/ILCT**

**Prof. Dr. Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior**  
**EPAMIG/ILCT**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, que iluminou meus caminhos nessa jornada e me permitiu viver com sabedoria esse momento que tanto desejei. Ao meu companheiro de caminhada, que sempre me apoia a buscar novos caminhos e me acolheu nos momentos de caos acadêmico, obrigada por tanto. Às minhas amigas que sempre me incentivaram, me levantaram e apoiaram.

À minha querida orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise Sobral, pela qual tenho profunda admiração como profissional e pessoa, sempre prestativa e atenciosa. Obrigada pela orientação, por acreditar em mim e acreditar que eu faria a diferença nesse trabalho tão bonito que você idealizou com carinho. Minha gratidão a você é eterna. À minha coorientadora Dr<sup>ª</sup> Gisela Magalhães, agradeço a você pelos ensinamentos e dedicação a este trabalho, e por me conduzir com muita paciência em todas as etapas. Senti-me lisonjeada por ter estado ao seu lado, aprendi muito. Grata por tudo. À minha coorientadora Dr<sup>ª</sup> Renata Golin, que sempre se colocou à disposição em ajudar e transmitir seus conhecimentos, grata pela gentileza.

Aos ilustres membros da banca, obrigada por aceitarem nosso convite e estarem conosco nessa reta final, tenho certeza que a contribuição de vocês vai agregar muito conhecimento.

Aos professores do ILCT, obrigada pelos conhecimentos transmitidos ao longo dessa intensa jornada de estudos. Aos meus colegas de turma, obrigada pela ajuda e companheirismo.

## RESUMO

Em virtude dos grandes e múltiplos benefícios do aleitamento materno, sua prática tornou-se mundialmente reconhecida e recomendada, sendo importante para a cobertura dos requerimentos nutricionais do lactente e seus benefícios se estendem em todo o ciclo de vida. O leite humano possui inúmeras vantagens: aspectos higiênicos, imunológicos, psico-sociais, cognitivo e deve ser considerada ainda a vantagem econômica por ser de baixo custo, uma vez que é produzido pela nutriz. Sua composição nutricional balanceada em termos de proteínas, carboidratos e gorduras, promove o crescimento e desenvolvimento adequado aos recém-nascidos. Considerando a rotina de análises de macronutrientes nos Bancos de Leite Humano e a importância da sua determinação e conhecimento uma vez que englobam o valor energético total do leite humano, o presente trabalho propôs a adaptação de um método analítico simples e rápido de quantificação de proteína em leite humano. Como objeto de estudo foi utilizado o método do formol e como base comparativa foi utilizado o método de kjeldahl (método padrão). Na fase dos pré-testes foram realizadas miniaturização do método, troca de concentração de solução alcalina e avaliação da utilização do oxalato de potássio. Ao correlacionar os métodos de kjeldahl e formol foram estabelecidas equações de regressão para determinação de proteína pelo método de formol em leite humano nos diferentes estágios de lactação. Neste estudo, ainda que ajustes sejam necessários, o método de formol adaptado apresenta confiabilidade; e na prática destaca-se pela rápida execução e aplicabilidade ao ser comparado com o método de referência, podendo, portanto, ser indicado na rotina dos bancos de leite humano.

**Palavras-chave:** Banco de Leite Humano. Kjeldahl. Nutrientes.

## ABSTRACT

Due to the large and multiple benefits of breastfeeding, its practice has become known and recommended worldwide, being important to the covering of the nutritional requirements of the infant, and its benefits extend through the entire circle of life. Human milk has uncountable advantages: hygienic, immunological, psychosocial, cognitive aspects; and, beyond that, the economic advantage must be considered, for the human milk has low cost, since it is produced by the nurse. Its nutritional composition balanced in terms of proteins, carbohydrates and fats promotes adequate growing and development to newborns. Considering the routines of macronutrients analysis in human milk banks and the importance of determining and knowing other macronutrients that involve the total energetic value of the human milk, the present work puts forward the adaptation of a simple analytic method, based on quantification of crude protein in human milk. As the study object, the formaldehyde method was used, and, as a comparative base, the Kjeldahl method - standard method. Method miniaturization, alkaline solution concentration change and evaluation of the use of potassium oxalate were used in the preliminary tests phase. When linking the Kjeldahl and formaldehyde methods, regression equations were established to determine crude protein through formaldehyde method in human milk in different lactation levels. In this proposal, even if adjustments are necessary, the adapted formaldehyde method shows reliability; and, in practice, it highlights itself by fast execution and applicability when compared to the reference method, therefore being indicated in human milk banks routines.

**Keywords:** Nutrients. Kjeldahl. Human milk bank.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Diferença entre os parâmetros dos métodos de formol tradicional e adaptado para determinação de proteína .....33
- Tabela 2.** Resultados do percentual de proteína, obtidos através das médias das duplicatas para o método do Formol adaptado e Kjeldahl para leite humano em diferentes fases de lactação\* .....34
- Tabela 3.** ANOVA da regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano em todos os estágios de lactação.....35
- Tabela 4.** ANOVA da regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de colostro.....37
- Tabela 5.** ANOVA da regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano de transição.....39
- Tabela 6.** ANOVA da regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano maduro.....41
- Tabela 7.** Apresenta um resumo das fórmulas de correlação entre o método do formol adaptado e kjeldahl para determinação de proteína em leite humano.....42

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reação do formaldeído (HCOH) com proteínas.....28
- Figura 2.** Representação esquemática do método do formol adaptado para determinação do teor de proteína em leite humano.....32
- Figura 3.** Regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano em todos os estágios de lactação.....35
- Figura 4.** Regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de colostro.....37
- Figura 5.** Regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano de transição.....39
- Figura 6.** Regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano maduro.....40

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 O LEITE HUMANO .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 IMPORTÂNCIA DO LEITE HUMANO.....</b>	<b>14</b>
3.3 ESTÁGIOS DA LACTAÇÃO.....	15
<b>3.3.1 Colostro.....</b>	<b>16</b>
3.3.2 Leite de transição.....	17
3.3.3 Leite Maduro.....	17
3.4 COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO LEITE HUMANO.....	17
<b>3.4.1 Composição de macronutrientes.....</b>	<b>18</b>
3.4.1.1 <i>Carboidratos</i> .....	18
3.4.1.2 <i>Proteínas</i> .....	19
3.4.1.2.1 Diferença entre as proteínas do leite humano e leite de vaca.....	20
3.4.1.1 <i>Lipídeos</i> .....	20
<b>3.4.2 Composição de micronutrientes.....</b>	<b>21</b>
3.4.2.1 <i>Composição de minerais</i> .....	22
3.4.2.2 <i>Composição de vitaminas</i> .....	22
3.5 PAPEL DOS BANCOS DE LEITE HUMANO.....	23
3.6 ANÁLISES DE ROTINA DOS BANCOS DE LEITE HUMANO.....	24
<b>3.6.1 Análise de Acidez Titulável.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6.2 Análise de crematócrito.....</b>	<b>25</b>
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM ALIMENTOS.....	25
<b>3.7.1 Método de kjeldahl.....</b>	<b>26</b>
3.7.1.1 <i>Etapas do método de kjeldahl</i> .....	26
<b>3.7.1 Método do formol.....</b>	<b>27</b>

3.8 UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE FORMOL COMO ALTERNATIVA AO MÉTODO DE KJELDAHL PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS S.....	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1 NÚMERO E SELAÇÃO DE AMOSTRAS.....	29
4.2 PRÉ – TESTES.....	30
4.2.1 Primeira fase dos pré - testes.....	30
4.2.2 Segunda fase dos pré - testes.....	30
4.3 MÉTODOS DE ANÁLISES.....	31
4.3.1 Quantificação das proteínas pelo método de kjeldahl.....	31
4.3.2 Quantificação das proteínas pelo método do formol adaptado.....	31
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
5.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE LEITE HUMANO PELO MÉTODO DO FORMOL ADAPTADO E DE KJELDAHL.....	33
5.3 CORRELAÇÃO DOS MÉTODOS CONSIDERANDO CONCOMITANTEMENTE TODOS OS ESTÁGIOS DE LACTAÇÃO DO LEITE HUMANO.....	34
5.4 RESULTADOS PARA COLOSTRO.....	36
5.5 RESULTADOS PARA LEITE DE TRANSIÇÃO.....	38
5.6 RESULTADOS PARA LEITE MADURO.....	40
5.7 RESUMO DAS FÓRMULAS DE CORRELAÇÃO ENTRE O MÉTODO DO FORMOL DAPTADO E KJELDAHL PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA EM LEITE HUMANO.....	41
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil vem desenvolvendo, ao longo de 30 anos, ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno, no sentido de aumentar as taxas de amamentação no país (COUTINHO *et al.*, 2019). Nas últimas três décadas, o Aleitamento Materno Exclusivo (AME) no Brasil apresentou constante crescente, seguindo de uma estabilização em 2013 que foi de 36,6%. Os resultados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) de 2013 apontam o Brasil como um país bem sucedido na promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno, trazendo reconhecimento internacional (BOCCOLINI *et al.*, 2017).

O leite humano não é apenas uma fonte de nutrientes especificamente adaptados às necessidades do bebê, ele também desempenha papel importante sobre o metabolismo, que se desdobra desde as divisões celulares até o comportamento do bebê (ANDREAS *et al.*, 2015). De acordo com Novaes (2009) alguns estudos destacam os benefícios do aleitamento materno para a saúde infantil também em longo prazo, tais como: redução na incidência de obesidade, hipertensão arterial, dislipidemias, diabetes e câncer. O aleitamento materno é a mais sábia estratégia natural de vínculo, afeto, proteção e nutrição para a criança e constitui a mais sensível, econômica e eficaz intervenção para redução da morbimortalidade infantil (BRASIL, 2010). O aleitamento envolve, além da relação mãe e filho, a formação do hábito alimentar da criança, uma vez que, a dieta da mãe altera o paladar do leite materno e os diferentes sabores interferem na ingestão do lactente, podendo este ser um fator importante quanto à melhora da alimentação de muitas crianças com sobrepeso (NOVAES, 2009).

Além de ser um direito garantido pelo Estatuto da Criança e do Adolescente, que prevê, em seu artigo 9º, que “o poder público, as instituições e os empregadores propiciarão condições adequadas ao aleitamento materno, inclusive aos filhos de mães submetidas à medida privativa de liberdade” (BRASIL, 1990), o aleitamento materno tem o potencial de reduzir a mortalidade neonatal, que incide até o 28º dia de vida. Conforme pontua o relatório sobre aleitamento materno do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI), a adoção generalizada da prática evitaria a morte de 800 mil crianças anualmente (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, 2021). Realizado em 2019, o Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil aferiu em 45, 8% a prevalência do aleitamento materno exclusivo em crianças brasileiras nos primeiros seis meses de vida. Trata-se de taxa ainda longe da meta estabelecida pela Organização Mundial da Saúde, que prevê a cobertura de 60% de crianças de até seis meses de vida alimentadas exclusivamente com aleitamento materno até 2030 (WHO, 2019).

Dentre as estratégias para a promoção da saúde materno infantil adotadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) destaca-se a instituição da Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (rBLH). Instituída em 1998 a partir da parceria entre a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e o Ministério da Saúde, a Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano foi reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma ação efetiva no combate à mortalidade infantil, constituindo-se em um modelo global de boa prática em políticas públicas para a saúde materno-infantil (OMS, 2011). A eficácia da amamentação e/ou o uso de leite humano, por meio de bancos de leite, conferem benefícios nutricionais para a criança em todas as fases de sua vida (ALMEIDA, 1999). Com o objetivo de fortalecer a assistência proporcionada à mulher e ao recém-nascido, a Rede Nacional de Bancos de Leite Humano atua, então, como a estratégia principal no fortalecimento do aleitamento materno, e essa Rede tem como missão consolidar a importância dos Bancos de Leite Humano. A Rede de Bancos de Leite Humano engloba os Bancos de Leite distribuídos pelo País, tendo como centro de referência a estrutura organizacional do Banco de Leite Humano da FIOCRUZ, localizado no Rio de Janeiro. Essa organização é representada em cada Estado por um centro de referência e suas comissões (MAIA *et al.*, 2004).

O leite humano possui uma composição nutricional adequada e balanceada de proteínas, carboidratos e gorduras; além de vitaminas e minerais essenciais ao organismo (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2018). O recém-nascido e o lactente apresentam atividade anabólica intensa, diferente de qualquer outro período de sua vida e essa atividade necessita de uma oferta adequada de proteínas nos primeiros seis meses de vida (VIEIRA *et al.*, 2004). As proteínas desempenham papel importante para os recém-nascidos a termo, pré-termo e lactentes, sua atuação se desdobra em função enzimática, transporte e síntese de vários componentes, função metabólica e atuam como agentes anti-infecciosos e imunomoduladores (CALIL; FALCÃO, 2003). O leite humano fornece em média 1,2g de proteína em 100 mL e estas proteínas podem ser divididas em proteínas do soro e as caseínas (CALIL; FALCÃO, 2003).

Nas duas últimas décadas, as intensas campanhas de incentivo ao aleitamento materno no Brasil vêm acompanhando o aumento de pesquisas relacionadas à composição nutricional e aos benefícios do leite humano (COSTA; SABARENSE, 2010). Segundo Accioly *et al.* (2009), conhecer a composição dos nutrientes no leite humano e entender sua importância no metabolismo, auxilia no desenvolvimento adequado dos bebês. Para Vieira *et al.*, (2004), o uso de estratégias para avaliação do conteúdo energético do leite humano, inclusive, nas

unidades neonatais pode colaborar para a sustentação deste como o alimento preferencial em relação ao uso de fórmulas infantis.

Nas rotinas de Bancos de Leite Humano, o único método para determinar o conteúdo energético do leite humano é o crematócrito, técnica analítica para a determinação do creme, que permite o cálculo estimado do conteúdo energético do leite humano (ALMEIDA; NOVAK; GUIMARÃES, 2011).

Com foco na importância do conhecimento do teor das proteínas para o crescimento e o desenvolvimento adequados dos lactentes e considerando a rotina de análises de macronutrientes nos bancos de leite humano e a importância da determinação e conhecimento dos demais macronutrientes que englobam o valor energético total do leite humano além da gordura, a presente dissertação propôs a adaptação de um método analítico para quantificação de proteína em leite humano. O objetivo deste estudo foi adaptar o método do formol para leite humano. O método de formol quantifica proteína em leite de vaca e é um método rápido e prático, baseado em titulação (BEZZERRA *et al.*, 2008). Este método é de grande relevância por apresentar baixo custo, rápida execução e aplicabilidade na análise de proteínas (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Como base comparativa para a realização do estudo foi utilizado o método de quantificação de proteína por kjeldhal. De acordo com Bezzerra *et al.* (2008), este método é o padrão para quantificação de proteínas e tem sido de grande relevância em estudos que envolvem produtos lácteos. O método de Kjeldahl é o mais utilizado para a determinação de nitrogênio e conteúdo protéico em alimentos por sua ampla aplicabilidade, seu alto nível de precisão e reprodutibilidade; porém é um método demorado em sua aplicação, apresentando dificuldade de uma digestão rápida sem perda de nitrogênio (VIEIRA, *et al.*, 2016).

A adaptação do método do formol para leite humano poderá ser inserida na rotina dos bancos de leite, permitindo melhor informação sobre composição nutricional e do valor energético do leite humano, podendo melhor destiná-lo no atendimento aos recém-nascidos prematuros e lactentes atendidos pela rede de bancos de leite humano.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo adaptar um método analítico de quantificação de proteínas pelo método de formol, historicamente aplicado às análises de leites de vaca, para leite humano.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar o método de análise de proteína pelo método do formol de leite de vaca para leite humano, reduzindo o volume de amostra analisada e propor outras alterações necessárias;
- Determinar a proteína de amostras de leite humano por método de kjeldahl;
- Realizar análise das amostras de leite humano por método do formol adaptado;
- Correlacionar os métodos de kjeldahl e formol para estabelecer as equações de regressão para determinação de proteína pelo método de formol em leite humano de diferentes estágios de lactação;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 O LEITE HUMANO

O leite é um produto secretado pelas glândulas mamárias das fêmeas logo após parto, sendo um alimento indispensável aos mamíferos nos primeiros meses de vida (PINHEIRO; SILVA, 2010). Ele apresenta em sua composição mais de 250 substâncias distintas, dispostas de forma hierarquizada e categorizadas, integrando três importantes frações: emulsão, suspensão e solução (ALMEIDA *et al.*, 2021).

A fração emulsão agrupa os constituintes lipossolúveis – gordura, óleos, vitaminas e pigmentos lipossolúveis. Os constituintes lipossolúveis se apresentam na forma de glóbulos, que são revestidos por uma membrana fosfolipoprotéica, essa membrana é responsável por conferir equilíbrio à emulsão. A fração suspensão é composta de micelas de caseína, cujo equilíbrio é conferido pela fração  $\kappa$ -caseína, essa fração protéica reveste a micela. A fração solução engloba a água, principais componentes do leite humano, nessa solução também estão presentes, as proteínas do soro, sais minerais, carboidratos e a maior parte dos bioativos imunobiológicos presentes no leite humano (ALMEIDA *et al.*, 2021).

O leite de vaca difere-se nutricionalmente do leite humano na quantidade e qualidade protéica, pois apresenta elevada concentração de caseína, não sendo adequado às necessidades do recém-nascido humano (CALIL *et al.*, 2003). No leite humano a baixa concentração de caseína resulta na formação de coalho gástrico mais leve, de forma a melhorar a digestão e reduzir o tempo de esvaziamento gástrico (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2018).

#### 3.2 IMPORTÂNCIA DO LEITE HUMANO

Conforme disposto em documentos da Organização Mundial da Saúde citados por João Aprígio de Almeida, o leite relaciona-se ao desenvolvimento de diversos processos de formação do ser humano. O leite humano é mais do que uma compilação de nutrientes, ele é uma substância com ampla complexidade biológica, desempenha papel protetor e imunomodulador, auxiliando no desenvolvimento adequado do bebê. Além disso, contempla substâncias antiinflamatórias importantes cujas funções ainda estão sendo estudadas (ALMEIDA, 1999).

É a primeira alimentação do recém-nascido, sendo fonte de nutrientes para as funções biológicas, desempenha papel muito importante na proteção contra doenças infecciosas, na

adequação nutricional e no desenvolvimento afetivo e psicológico do recém-nascido (CALIL; FALCÃO, 2013). Considerado o alimento mais adequado às necessidades da criança, serve como referência para se estabelecer os requerimentos nutricionais nessa faixa etária (MORGANO *et al.*, 2005). O leite humano é capaz de suprir exclusivamente todas as necessidades da criança nos primeiros seis meses de vida; e por ser da mesma natureza é mais bem digerido e absorvido quando comparado aos leites de outras espécies (BRASIL, 2009).

Estão incluídos na composição do leite humano nutrientes importantes, células vivas de defesa e também imunoglobulinas (IgA e IgG), estes compostos atuam melhorando o funcionamento do sistema imunológico; além da presença do fatores bífido e antiestafilocócico que são elementos protetores do leite materno contra doenças gastrintestinais (NOVAES, 2009). Em estudo de rastreamento literário sistemático sobre elementos protetores do leite materno na prevenção de doenças gastrintestinais e respiratórias, realizado por Accioly *et al.* (2009) constatou-se que a IgA é a imunoglobulina com maior capacidade protetora em ambos os tipos de doenças, devido a sua capacidade de resistir às mucosas intestinal e respiratória, além disso o levantamento expõe que o leite materno também possui outras imunoglobulinas, oligossacarídeos, lipídeos, peptídeos bioativos, que além da proteção contra essas doenças, estimulam o desenvolvimento do sistema imune do lactente.

É importante destacar que, além de ser uma fonte de nutrição, o leite materno contém compostos biologicamente ativos que também auxiliam no desenvolvimento da microbiota intestinal (ANDREAS *et al.*, 2015) e ainda de acordo com Novaes (2009), é possível que os lactentes amamentados desenvolvam mecanismos mais eficientes para regular sua ingestão energética, pois o ato permite à criança controlar a quantidade do leite consumido, baseado no controle da saciedade interna.

### 3.3 ESTÁGIOS DA LACTAÇÃO

A lactação é um processo complementar à gestação, de grande impacto na saúde do lactente. Durante a gravidez, as glândulas mamárias se preparam para a lactação através de uma série de transições importantes (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2018).

O leite humano modifica sua composição durante toda a lactância, proporcionando aos lactentes nutrientes e componentes específicos em quantidades adequadas a cada idade e situação; dessa forma, não existe processo capaz de reproduzir artificialmente os efeitos

completos e eficazes das substâncias bioativas presentes no leite humano (SILVA *et al.*, 2014).

De acordo com o período pós-parto o leite materno pode ser classificado como colostro, leite de transição e leite maduro, sendo cada fase acompanhada de uma composição nutricional diferenciada (NASCIMENTO; ISSER, 2003). Segundo Calil *et al.* (1992), as alterações na composição do leite humano transcorrem da variada necessidade do lactante.

Em bancos de leite humano, para se determinar a classificação das fases da lactação, deve-se considerar a informação prestada pela paciente em seu cadastro de doadora, levando em consideração a idade gestacional no momento do parto e a idade da lactação em dias em que o leite foi coletado (ALMEIDA *et al.*, 2021).

### 3.3.1 Colostro

O colostro é o primeiro leite com o qual o recém-nascido tem contato, sendo o primeiro produto da secreção láctea, obtido em média até sete dias após o parto (ALMEIDA *et al.*, 2021). É um líquido amarelado, viscoso, que se encontra nos alvéolos das mamas desde o último trimestre da gestação, até os primeiros dias do pós-parto (AKRÉ, 1997). Em geral, a “descida do leite” acontece até 30 horas após o parto (ALMEIDA, 1999).

Quando comparado ao leite maduro, o colostro é mais viscoso, com maiores concentrações de proteínas, minerais e vitaminas lipossolúveis, particularmente A, E, e carotenoides, menores quantidades de lactose, gorduras e vitaminas do complexo B (ALMEIDA; NOVAK, 1995). É muito rico em fatores de defesa, como imunoglobulinas, substâncias imunomoduladoras, agentes anti-inflamatórios, dentre os quais se destacam os fatores de crescimento ou tróficos, e ainda os leucócitos (ANDREAS *et al.*, 2015).

O volume de colostro produzido varia entre 2 a 20 mL por mamada nos três primeiros dias após o parto; podendo variar de acordo com a situação de paridade materna, pois mulheres que já amamentaram o produzem com maior facilidade (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2018).

As imunoglobulinas representam a maior parte de sua fração protéica, sendo de grande relevância para proteção do recém-nascido, porém os níveis de anticorpos sofrem rápido e relevante declínio nos primeiros dias de vida (ANDREAS *et al.*, 2015).

### 3.3.2 Leite de transição

A produção do leite de transição é uma combinação de colostro (o primeiro estágio do leite materno) e leite materno maduro (o terceiro e último estágio do leite materno) (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2018). De acordo com Almeida *et al.*, (2021) leite de transição é o produto intermediário entre o colostro e o leite maduro, sendo obtido em média entre o 7º e o 15º dia após o parto.

Sua aparência é mais rala e vai se modificando de forma gradativa para atender às demandas do recém-nascido, adaptando-se às suas necessidades nutricionais e digestivas (ANDREAS *et al.*, 2015). Nessa fase da lactação ocorre o aumento da produção do leite para dar suporte ao desenvolvimento e às necessidades nutricionais do bebê em desenvolvimento, (GARWOLINSKA *et al.*, 2018).

A concentração de imunoglobulinas e o teor de vitaminas lipossolúveis tornam-se progressivamente menores, enquanto aumenta o conteúdo de vitaminas hidrossolúveis, lipídeos e lactose, com conseqüente acréscimo do aporte calórico (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2018).

### 3.3.3 Leite maduro

É uma mistura homogênea com três partes: emulsão (gotículas de gordura), suspensão (partículas coloidais de caseína) e solução (componentes hidrossolúveis). Sua cor é mais branca e aspecto mais consistente, sua produção aumenta ao longo da lactação em função das necessidades da criança (AKRÉ, 1997). O leite maduro é secretado do 15º dia em diante após o parto, sendo considerado o produto final do processo de amamentação (ALMEIDA *et al.*, 2021)

O leite maduro possui maior teor lipídico e de lactose, apresentando menor quantidade de proteínas, contendo ainda grande parte dos minerais e vitaminas lipossolúveis (ANDREAS *et al.*, 2015).

## 3.4 COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO LEITE HUMANO

Apesar de a alimentação apresentar efeito sobre o leite materno, o leite de diferentes mães apresenta composição semelhante. Apenas aquelas com desnutrição grave podem ter o seu leite afetado na sua qualidade nutricional (BRASIL, 2009).

O leite humano é composto aproximadamente por 88% de água, sendo isotônico em relação ao plasma, além de conter vitaminas, minerais, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, proteínas e imunoglobulinas (NASCIMENTO; ISSER, 2003).

As soroproteínas no leite humano constituem cerca de 60 a 90% de seu teor proteico total; as gorduras constituem a maior fonte de energia do leite humano, sendo aproximadamente 45 a 55% do valor calórico total; já a lactose constitui cerca de 70% do conteúdo de carboidratos do leite humano (CALIL *et al.*, 2003).

A composição do leite humano, especialmente quanto à presença de nutrientes é variável e pode ser influenciada por diversos fatores como genética, estado nutricional materno, período de lactação, composição da dieta materna, hormônios, idade gestacional e variação diária entre as lactações (OLIVEIRA, 2006; COUTINHO, 2019).

### **3.4.1 Composição de macronutrientes**

#### *3.4.1.1 Carboidratos*

A lactose é o maior componente de açúcar/carboidrato do leite humano. Sendo a principal fonte de energia para o desenvolvimento do cérebro humano (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2018). Sua concentração no colostro é de 5,3 gramas em 100 mL, elevando-se para 7 gramas no leite maduro. A lactose fornece de 45 a 50% do conteúdo energético total do leite humano, os outros carboidratos, presentes em concentrações inferiores, são representados pela glicose, galactose, oligossacarídeos complexos e glicoproteínas (CALIL *et al.*, 1992).

A elevada concentração de lactose no leite humano é de grande importância para o organismo do recém-nascido pré-termo, a termo e do lactente, pois seu produto metabólico integra o sistema nervoso central (VIEIRA *et al.*, 2004).

De acordo com Calil e Falcão (2003) a permanência de uma pequena porção de carboidrato na luz intestinal ocasiona efeitos benéficos para a criança, como: eliminação de fezes mais amolecidas, reduzindo incidência de constipação intestinal; promoção do crescimento da microbiota não patogênica; ação facilitadora sobre absorção de cálcio e fósforo, o que auxilia na prevenção da doença metabólica óssea em recém-nascidos.

### 3.4.1.2 Proteínas

As proteínas do leite materno possuem diversas funções importantes, contêm todos os aminoácidos essenciais, que atuam como fatores de proteção, transportam hormônios e vitaminas (CALIL; FALCÃO 2003).

O leite humano maduro fornece em média 1,2 g de proteína por 100 mL e gera de 6 a 7% de energia para o lactente, estas proteínas podem ser divididas em duas categorias: as proteínas do soro e as caseínas. Cerca de 80% das proteínas do leite são compostas por  $\alpha$ -lactoalbumina e 20% pelas caseínas (BRUXEL; SICA, 2019).

De acordo com Andreas Kampmann e Mehring Le-Doare (2015), há uma elevação do teor da caseína do leite humano durante a lactação, acompanhada de um decréscimo dos níveis de proteínas do soro, onde a relação proteínas do soro/caseína, que é de 90:10 no início da lactação, modifica-se, atingindo valores de 60:40 ou até de 50:50 na fase do leite maduro.

As proteínas do soro compõem cerca de 60 a 90% do teor protéico total no leite materno e sua composição inclui a  $\alpha$ -lactoalbumina, a lactoferrina, a lisozima, a soro albumina, as imunoglobulinas e a  $\beta$ -lactoglobulina (NASCIMENTO; ISSER, 2003). A  $\alpha$ -lactalbumina constitui cerca de 40% das proteínas do soro do leite humano, sendo imprescindível para o transporte de ferro e síntese de lactose na glândula mamária (NASCIMENTO; ISSER, 2003). A  $\alpha$ -lactoalbumina e a  $\beta$ -caseína fornecem a maior parte dos aminoácidos aos lactentes; a lactoferrina é importante no processo de absorção do ferro, além de atuar como bactericida (BRUXEL; SICA, 2019). A taurina, aminoácido importante e essencial para o recém-nascido, atua na conjugação de sais biliares, melhorando a absorção lipídica, além de atuar também no transporte de zinco e a glutamina, aminoácido igualmente essencial, auxilia no crescimento de epitélio gastrointestinal, promovendo uma barreira importante de proteção (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2018).

De acordo com Akre (1997), alguns estudos demonstraram que as proteínas nutricionalmente disponíveis no leite humano podem ser menores que 8% se corrigidas para soroproteínas, que resistem à proteólise não sendo absorvidas. As proteínas exercem outras funções biológicas no organismo do lactente além do papel nutricional, especialmente aquelas não absorvidas. Essas funções estão relacionadas à absorção e ao transporte de nutrientes, atuam como fatores de proteção contra agentes infecciosos e imunomoduladores e crescimento na função hormonal, além disso, as proteínas não absorvidas atuam como enzimas (DONOVAN, 2019).

O leite humano possui mais de 70 enzimas que são divididas de acordo com o seu desempenho fisiológico, sendo elas: enzimas com atividade na glândula mamária, essas enzimas atuam no transporte e síntese de componentes do leite humano; enzimas com atividade predominante no recém-nascido, a presença dessas enzimas melhora a digestão e metabolismo do recém-nascido e as enzimas lácteas sem função bem estabelecida (CALIL; RAMOS, 2003).

#### 3.4.1.2.1 Diferença entre as proteínas do leite humano e de vaca

Sobre o conteúdo protéico no leite humano, constata-se que 80% é lactoalbumina, sendo a relação proteínas do soro/caseína no leite humano é aproximadamente 80/20, enquanto a no leite bovino é 20/80 (SILVA *et al.*, 2014). Outra diferença significativa entre leite de vaca e leite humano encontra-se nas concentrações de aminoácidos de alto valor biológico como a cistina e taurina, sendo elas superiores em leite humano (SILVA *et al.*, 2014).

O leite humano contém de 1 g a 1,5 g de proteínas em 100 mL comparadas aos 3,3 g em 100 mL no leite de vaca. A concentração elevada de proteínas no leite de vaca resulta basicamente da predominância da caseína (GUERRA *et al.*, 2011). As soroproteínas predominantes no leite humano são a  $\alpha$ -lactoalbumina, a lactoferrina, a lisozima, imunoglobulinas e albumina sérica; o leite de vaca contém essas proteínas, embora em concentrações diferentes; sendo as principais soroproteínas as  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina, sendo a  $\beta$ -lactoglobulina a soroproteína presente em maior concentração no leite de vaca, esta por sua vez apresenta-se em baixa concentração no leite humano (GUERRA *et al.*, 2011).

#### 3.4.1.3 Lipídeos

A gordura presente no leite materno é a maior fonte de energia para os lactentes e apresenta-se especialmente na forma de triacilgliceróis e fosfolipídeos, mas também como colesterol, sendo diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicolipídeos e ésteres de colesterol (BRUXEL; SICA; 2019).

A fração lipídica apresenta um conteúdo médio de 4,2 % em 100 mL, sendo constituída principalmente por triacilgliceróis (98%), contribuindo com 40% a 55% do total de energia consumida pelo recém-nascido em aleitamento materno exclusivo (COSTA;

SABARENSE, 2010). O restante refere-se a pequenas quantidades de fosfolípidos, colesterol e produtos da lipólise, tais como ácidos graxos livres monoinsaturados e diacilgliceróis (CALIL; FALCÃO, 2013). O leite humano ordenhado possui em média 40g de gordura por Litro. Até a 10<sup>a</sup> semana do pós-parto, os lipídios mantêm-se constantes em torno de 6,4% e a partir da 11<sup>a</sup> semana pós-parto, elevam-se para 7,1%, mantendo-se constante até a 62<sup>a</sup> semana (ALMEIDA *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que o leite secretado no início da mamada é mais rico em carboidratos e o leite posterior é rico em lipídios; essa quantidade maior de lipídios é necessária para o ganho de peso do bebê (BLESA *et al.*, 2019). Durante a mamada existe um aumento significativo do teor de gorduras, sendo o leite final com concentração lipídica três vezes maior quando comparado ao leite inicial (CALIL; FALCÃO, 2003).

Segundo Calil e Ramos (2013), esta diferença lipídica entre os leites inicial e final poderiam ser decorrentes do fenômeno de absorção dos glóbulos de gordura à superfície secretora e aos dutos dos alvéolos mamários, resultando em sua liberação tardia durante a mamada. A concentração alta de gordura no leite final age como regulador de apetite, embora não se tenha demonstrado isto em bebês alimentados de outras formas com conteúdo variável de gordura (AKRÉ, 1997).

### **3.4.2 Composição de micronutrientes**

A composição do leite humano, especialmente quanto à presença de micronutrientes, é muito variada e pode ser influenciada por diversos fatores, havendo inclusive diferenças entre o leite da frente e o último a sair (anterior e posterior), com alterações na concentração dos macros e dos micronutrientes (MORGANO, 2005).

Sabe-se que a composição do leite humano varia conforme o estágio da lactação e mesmo entre as nutrizes (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2018). Procedimentos que permitam avaliar as concentrações dos micronutrientes do leite humano são necessários, uma vez que essas deficiências em nutrizes podem ocasionar prejuízos no crescimento e desenvolvimento dos bebês (CALIL, 2013).

No leite humano são encontradas minerais e vitaminas que atuam como componentes estruturais em tecidos, cofatores enzimáticos, potencializam a formação e ação do sistema imunológico, participam da síntese de novas substâncias, dentre outras importantes atividades (MORGANO *et al.*, 2005).

### 3.4.2.1 Composição de minerais

De acordo com Bruxel; Sica (2019), os teores de minerais podem variar entre as lactantes, sendo o colostro o tipo de leite que apresenta níveis mais elevados, seguido pelo leite de transição e pelo leite maduro.

Os minerais são classificados em macroelementos e microelementos, sendo os macro: sódio, potássio, cálcio, magnésio e fósforo, entre outros; e microelementos ou elementos traços: cobalto, cobre, iodo, flúor, molibdênio, selênio, cromo, ferro, zinco e outros (SEVERO *et al.*, 2015). Essa classificação corresponde à quantidade diária necessária para o bom funcionamento do organismo – elevada para os macroelementos e reduzida para microelementos.

A necessidade de microelementos em lactentes é maior que a de crianças e adultos devido à alta demanda bioquímica de vias metabólicas atuando no crescimento e desenvolvimento do organismo (MORGANO, 2005).

A concentração de cobre, zinco e ferro no leite não depende da concentração desses minerais no organismo da mãe (DOMELLÖF *et al.*, 2004). O zinco, por exemplo, que atua na diferenciação celular e metabolismo de proteínas e lipídeos, está presente no colostro em concentração até 17 vezes maior que o aquele presente no organismo materno (CHRISTIAN *et al.*, 2021). Provavelmente seja por isso que a suplementação de minerais ou sua deficiência na dieta materna não altera, significativamente, o aporte desses nutrientes para o leite (ERICK, 2018).

### 3.4.2.2 Composição de vitaminas

As vitaminas funcionam como catalisadores de reações metabólicas no organismo e podem ser classificadas em lipossolúveis e hidrossolúveis. Sua composição no leite humano pode variar de acordo com o estado nutricional materno, caindo quando há deficiência no organismo da mãe (ERICK, 2018). Por outro lado, a suplementação de vitamina C e D aumenta sua concentração no leite e pode contornar essa deficiência (BRAVI *et al.*, 2016).

O colostro é rico em vitaminas lipossolúveis e em geral tem baixa concentração de vitaminas hidrossolúveis. Em todos os períodos da lactação a concentração de vitaminas hidrossolúveis é mais diretamente influenciada pela dieta da mãe (CALIL *et al.*, 2003) e o conteúdo vitamínico total do leite varia significativamente ao longo do dia, de acordo com o ciclo circadiano.

As vitaminas são indispensáveis para o organismo, atuando como coenzimas em diversas vias. São essenciais no desenvolvimento imunológico e neural do lactente, na manutenção dos tecidos e no metabolismo do ferro e do cálcio (COUTINHO, 2019).

### 3.5 PAPEL DOS BANCOS DE LEITE HUMANO

Nas situações em que a mãe apresenta dificuldades para amamentar o filho, o leite coletado e processado em Bancos de Leite Humano deve constituir-se como uma alternativa segura que garanta o desenvolvimento da criança (BARROS *et al.*, 2018).

A Rede Brasileira de Banco de Leite Humano é considerada a maior e mais complexa do mundo pela Organização Mundial de Saúde. Dentre os 292 bancos de leite humano existentes no mundo, 72,9% deles estão no Brasil; essas unidades assistiram, entre 2008 e 2014, 88,5% (cerca de 11 milhões) de mulheres e contaram com o apoio de 93,2% doadoras de leite (1,1 milhão de brasileiras) (BORGIO *et al.*, 2005).

Os bancos de leite humano fazem parte do Sistema Único de Saúde como uma estratégia de atenção neonatal, vinculado às políticas de segurança alimentar e nutricional. Ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno são partes atribuídas aos bancos de leite humano, além da coleta, processamento, controle de qualidade e distribuição do leite humano pasteurizado para recém-nascidos a termo, pré-termo e lactentes de baixo peso ou hospitalizados em Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal. Sendo dessa forma, um elemento estratégico importante para colaborar com a redução da morbidade e mortalidade infantil (BARROS *et al.*, 2018).

Nos bancos de leite humano, a qualidade dos produtos processados, estocados e distribuídos deve ser parte de um sistema conectado que percorre todas as etapas, sem se restringir exclusivamente a análises laboratoriais (BORGIO *et al.*, 2005). Este leite, após criteriosa avaliação, deve estar adequado aos quesitos de inocuidade e valor nutritivo, suficientes para garantir o desenvolvimento sadio e correto do recém-nascido (BORGIO *et al.*, 2005).

O leite humano ordenhado é o produto manipulado em bancos de leite humano, onde são selecionados como receptores os lactentes pré-termos e recém-nascidos de baixo peso com dificuldade de sucção, diarreia protraída, alergia a proteínas heterólogas e situações em que a mãe encontra-se impossibilitada de amamentar (ALMEIDA *et al.*, 2021).

### 3.6 ANÁLISES DE ROTINA DOS BANCOS DE LEITE HUMANO

A qualidade do leite humano ordenhado distribuído pelo Banco de Leite Humano é uma pauta de extrema seriedade, pois os recém nascidos que consumirão este produto têm baixa resistência às infecções, logo, o consumo de leite contaminado pode gerar doenças (DANTAS, *et al.*, 2006).

Todo leite humano recebido pelo Banco de leite deve ser submetido a procedimentos iniciais de seleção e classificação, sendo etapas da seleção a verificação da embalagem, presença de sujidades, cor e *off-flavor* (ALMEIDA *et al.*, 2021). A classificação do leite humano envolve parâmetros como: período de lactação, verificação da Acidez Dornic e conteúdo energético por meio do Crematócrito (FIOCRUZ, 2008).

Crematócrito é a técnica analítica que permite o cálculo estimado do conteúdo energético do leite humano ordenhado (ALMEIDA *et al.*, 2021). Acidez Dornic do leite humano ordenhado é a acidez titulável expressa em graus Dornic (BRASIL, 2006). *Off-flavor* é a característica organoléptica não conforme com o aroma original do leite humano ordenhado (BRASIL, 2006).

Os leites que não se encaixam nas especificações determinadas quantos aos aspectos sensoriais (ausência de sujidades, cor e *off-flavor* característicos), físico-químicos (acidez Dornic entre 1º e 8ºD e crematócrito) e microbiológicos (ausência de coliforme a 35°C), deverão ser descartados (ALMEIDA *et al.*, 2021).

Em decorrência de sua própria composição, o leite humano apresenta uma acidez original. As micelas de caseína, as proteínas do soro do leite e os sais minerais são os principais responsáveis por essa característica química. À medida que a microbiota presente no leite humano encontra condições favoráveis para o crescimento, ocorre à produção de ácido láctico e a consequente elevação da acidez (ALMEIDA; NOVAK; GUIMARÃES, 2011). Em condições normais, o leite humano tende a apresentar pH situando-se entre 6,5 e 6,9 (ALMEIDA *et al.*, 2021).

Os leites que preenchem todas as especificações serão pasteurizados e categorizados de acordo com seu valor energético para em serem destinados aos recém-nascidos e bebês, conforme necessidade (ALMEIDA, *et al.*, 2021).

### 3.6.1 Análise de Acidez Titulável

Dentre as características físico-químicas do leite humano, a acidez desempenha um papel importante na avaliação pelos bancos de leite humano, uma vez sobrecargas ácidas ou básicas do leite humano resultam em acidose ou alcalose metabólica e a sua utilização pode causar enterocolite necrosante em recém-nascido pré-termo e nos a termo de baixo peso ao nascer (CAVALCANTE, 2005). A acidez é um parâmetro de qualidade pois um valor elevado indica que houve fermentação de lactose, com conseqüente aumento de ácido láctico. Essa fermentação pode indicar que o leite está com uma alta contaminação, ou que passou um período em temperaturas mais elevadas (caçar uma referência para esta informação).

A acidez Titulável é determinada com uma solução padrão que contenha um titulante alcalino, que na maioria das vezes é o hidróxido de sódio (NaOH). A técnica é baseada em uma reação entre o titulante alcalino padrão e os constituintes ácidos presentes no leite humano, até que aconteça neutralização. O ponto final da reação é determinado com o auxílio de um pHmetro ou por meio de soluções indicadoras, elaboradas com substâncias que possuem grupos cromóforos em sua composição. Por essa razão é que ocorre mudança de coloração na medida em que ocorre a mudança de pH (ALMEIDA *et al.*, 2021);

### 3.6.2 Análise de crematócrito

O crematócrito é um método pelo qual se determina a quantidade de creme e se estima a concentração de gordura e o conteúdo energético de uma amostra de leite humano. O método é simples e rápido e esta determinação do teor de gorduras deve ser realizada logo após as análises sensoriais do leite humano ordenhado (ALMEIDA *et al.*, 2021).

O método utilizado para determinar o conteúdo energético do leite humano consiste em centrifugar amostras de leite humano, medir a quantidade de gordura existente e, através de cálculos matemáticos e fórmulas específicas, determinar seu conteúdo energético (ALMEIDA *et al.*, 2021).

## 3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM ALIMENTOS

A determinação de proteínas é de extrema importância para conhecimento nutricional dos alimentos. Elas são tradicionalmente avaliadas pelo método de Kjeldahl, método de

referência, sendo o método mais exato para a determinação de proteína em alimentos (CECCHI, 2003).

Porém outro método relevante na quantificação de proteínas, por apresentar baixo custo, rápida execução e aplicabilidade, inclusive na realidade das indústrias de laticínios é o método do formol (OLIVEIRA *et al.*, 2006). O método do formol é baseado apenas em titulação e ação de reagentes; esse método quantifica proteína em produtos lácteos (COSTA JÚNIOR 2020).

De acordo com Gomes (2011) vários métodos podem ser empregados para análise das proteínas em produtos lácteos, mas dentre esses métodos, para lácteos os que mais se destacam são os métodos de Kjeldahl e Formol.

### **3.7.1 Método de kjeldahl**

O método de Kjeldahl foi desenvolvido pelo químico dinamarquês Gustav Kjeldahl em 1883 e, desde então, é utilizado para calcular o teor de proteína em diversos tipos de amostras orgânicas (WOLFSCHOON e VARGAS, 1977).

As proteínas lácteas têm sido tradicionalmente determinadas por meio do método de Kjeldahl, pois este método diferencia os teores de proteína, dos teores de proteína verdadeira e de caseína (BEZZERRA *et al.*, 2008).

O método de Kjeldahl determina o teor de nitrogênio de origem orgânica, onde fontes não proteicas como ácidos nucleicos, alcalóides, lipídeos nitrogenados, carboidratos nitrogenados, e pigmentos nitrogenados, também são aferidas pelo método (CECCHI, 2013).

#### *3.7.1.1 Etapas do método de kjeldahl*

Ao longo do tempo o método de kjeldhal passou algumas modificações quanto aos reagentes utilizados, contudo, o processo básico de análise continua o mesmo. Esse processo compreende três etapas: digestão, destilação e titulação (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984).

Na etapa da digestão, o nitrogênio é separado da amostra por meio da adição de uma solução de ácido sulfúrico e calor, na presença de catalisadores, resultando em sulfato de amônio. Este sulfato de amônio é convertido em amônia por reação com hidróxido de sódio e destilado por arraste de vapor até uma solução ácida, que fixa o nitrogênio. A quantidade do ácido consumida na etapa de titulação corresponde à quantidade de nitrogênio da amostra. O

teor de nitrogênio é multiplicado pelo Fator de Conversão específico de cada alimento para obter o teor de proteína (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2019).

### 3.7.2 Método do formol

Esse método foi inicialmente utilizado para quantificação de proteínas em 1905 e posteriormente otimizada com a adição de oxalato de potássio. É amplamente utilizado para análise de leite de vaca (WOLFSCHOON-POMBO e VARGAS, 1977).

A base deste método apresenta-se datado em 1905, quando Steinegger (1905), citado por Wolfschoon e Vargas, (1977) “demonstrou que o “Valor Aldeído” do leite como sendo a diferença entre a acidez original do leite e a acidez após a adição de formaldeído a 40%”. Subsequente, Richmond e Miller (1906), citado por Wolfschoon-Pombo e Vargas, (1977) “consideraram a possibilidade de se calcular a porcentagem de proteína do valor aldeído, sugerindo, além disso, um mecanismo para a reação do formaldeído”.

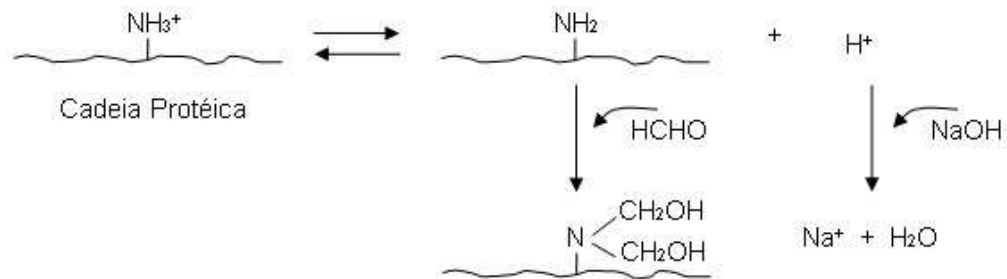
Uma modificação do método foi proposto por Pyne (1932) citado por Wolfschoon-Pombo e Vargas, (1977), onde avaliou-se que a metodologia poderia ser melhorada mediante adição de oxalato de potássio antes da titulação com formol.

A adição de oxalato na determinação da acidez do leite foi sugerida pela primeira vez por Van Slike e Bosworth em (1914); Pyne (1932) indicou que os fosfatos solúveis e coloidais afetam o valor do formaldeído (elevando-o ou diminuindo-o respectivamente) dependendo do álcali utilizado para titular. O uso de oxalato elimina estes efeitos, além de favorecer a determinação do ponto final da titulação, já que se elimina a palidez devida à formação de fosfato (WOLFSCHOON e VARGAS, 1977).

De acordo com Wolfschoon-Pombo e Vargas (1997), Schulz e colaboradores realizaram um intenso estudo do método de formol para determinação de proteína no leite de vaca, em que aperfeiçoaram e aplicaram o método nas práticas de laticínios.

O método de formol é utilizado para quantificar as proteínas a partir da reação com formaldeído, sendo um método barato, rápido e de fácil execução, além de não utilizar reagentes de complexa manipulação (GOMES, 2011). O método é baseado em uma titulação ácido-básica, onde é feita a medição dos prótons liberados pela reação do formaldeído com os grupos amino das cadeias laterais das proteínas, após prévia neutralização com álcali (NaOH) (COSTA JÚNIOR 2020). A figura 1 apresenta a reação do formaldeído com o grupo amino das proteínas.

Figura 1. Reação do formaldeído (HCHO) com proteínas



Fonte: GOMES; OLIVEIRA (2011).

### 3.8 UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE FORMOL COMO ALTERNATIVA AO MÉTODO DE KJELDAHL PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

Em estudo realizado por Almeida *et al.*, (2008), sobre comparação entre os métodos do Formol e de Kjeldahl para determinação de proteínas em leite, cujo objetivo foi correlacionar esses métodos em amostras de leite fluido (UHT), levando em consideração seus teores de proteína verdadeira e caseína, constatou-se um coeficiente de correlação de 70% entre os teores de proteína dos Métodos Kjeldahl e do Formol, confirmando com esses dados, a aplicabilidade do método formol na rotina de um laboratório de laticínio e de análises de alimentos.

Em 1977, Wolfschoon-Pombo e Vargas, avaliaram a aplicação de formol para determinação do conteúdo de proteína no leite cru e pasteurizado e constataram em seus resultados que os testes realizados nos leites tanto crus quanto pasteurizados, apresentaram valores de proteína notadamente comparáveis. O índice de correlação entre os dois métodos corroborou para utilidade e eficiência do método de formol na determinação de proteína do leite. Além disso, Wolfschoon-Pombo e Vargas (1977) destacam que o método também pode ser utilizado para verificação de excesso de acidez e sugere sua aplicabilidade para determinar o teor de proteína em outros subprodutos de laticínios.

Lourenço e Wolfschoon-Pombo (1982), destacam que o método de formol já era um método avaliado mundialmente, sendo considerado um método rápido de determinação de proteínas, tanto no leite, quanto no soro; e apresentava boa precisão tanto para baixos como

para altos teores de proteína. Em seu estudo sobre exatidão da determinação volumétrica de caseína no leite destinado à fabricação de queijo prato, Lourenço e Wolfschoon-Pombo ao correlacionar seus resultados obtidos com o método de formol com os de kjeldahl, apontou que os ambos não apresentaram diferença significativa estatisticamente, sendo, portanto, concluído que o método do formol poderia ser utilizado para a prática proposta no estudo.

Um estudo realizado por Silva, *et al.*, (1995), sobre desenvolvimento de uma metodologia analítica para avaliação de proteólise em queijos, foram desenvolvidas técnicas analíticas para determinação dos teores de nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12%. Os resultados para queijo prato no decorrer da maturação apontaram elevado grau de associação entre os resultados obtidos com os métodos de kjeldahl e do formol. A análise de queijos comerciais apresentou alta correlação com o método de referência, indicando que o método do formol é aplicável a diferentes tipos de queijos.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 NÚMERO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS**

As amostras de leite humano foram selecionadas e fornecidas pela FIOCRUZ - RJ e pelo Banco de Leite Humano de Juiz de Fora - MG. O leite humano fornecido para este estudo foi o de descarte, que geralmente apresenta não conformidades como a presença de sujidades. São considerados exemplos de sujidades comumente encontradas no leite humano ordenhado: pêlos, cabelos, pele, restos de alimentos, fragmento de unha, insetos, pedaços de papel, vidro etc. (ALMEIDA *et al.*, 2021). Desta forma, as amostras de leite humano utilizadas não prejudicaram o suprimento deste material para os hospitais credenciados na rede, e estavam aptas para o estudo proposto.

Realizou-se a parte experimental do trabalho no Laboratório de Pesquisa da EPAMIG Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Foi analisado um total de 17 amostras de leite humano, em diferentes estágios de lactação, sendo 4 amostras de colostro, 5 amostras de leite de transição e 8 amostras de leite maduro, sendo os ensaios realizados em duplicatas. As amostras estavam congeladas, o descongelamento foi realizado mantendo o frasco e/ou saco de leite congelado em água morna com troca recorrente em temperatura de 37 °C a 70 °C. A homogeneização das amostras foi realizada por inversões no frasco logo antes da pipetagem e a cada utilização das amostras.

## 4.2 PRÉ-TESTES

Os pré-testes foram realizados em duas etapas, onde na primeira etapa foi avaliada a possibilidade de correlação entre o método do formol e de Kjeldahl, tendo sido usado o mesmo método do formol para leite bovino em leite humano. A adaptação do método para diminuição da quantidade de leite humano para a realização da técnica, com consequente adequação das quantidades de reagentes, troca da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L por 0,111 mol/L (Dornic) e a utilização do oxalato, foram testados na segunda etapa dos pré-testes.

### 4.2.1 Primeira fase dos pré-testes

Para a primeira fase de testes foram utilizados 10 mL de leite humano. As amostras foram escolhidas aleatoriamente e foram realizados 10 ensaios em duplicata. Para os métodos de kjeldahl e formol as análises foram realizadas segundo Costa Júnior (2020).

### 4.2.2 Segunda fase do pré-teste

Na segunda fase foi feita a miniaturização do método, diminuindo todas as quantidades de reagente e amostra do método tradicional de determinação de proteína em leite de vaca pela técnica do formol em 10 vezes, e foi realizada a correlação com o método de kjeldahl. Dentro deste contexto de adaptação do método, foi realizada a troca da concentração do hidróxido de sódio de 0,1 mol/L para 0,111 mol/L (Dornic), e foi também avaliado o potencial efeito do oxalato de potássio nas amostras, sendo testadas amostras com e sem o reagente, e avaliando a correlação com o método de kjeldahl.

Essas adaptações levaram em consideração o método de análise de acidez em leite humano, para que o método adaptado do formol para determinação de proteína pudesse ser uma continuidade deste, sem gasto excedente de amostra ou troca de solução alcalina já usada para a acidez. Foram realizados testes com leites em diferentes estágios de lactação (colostro, leite de transição e leite maduro).

## 4.3 MÉTODOS DE ANÁLISES

### 4.3.1 Quantificação das proteínas pelo método de Kjeldahl

Foi utilizado para quantificação de proteína o método de kjeldahl segundo BRASIL (2006). Para conversão do teor de N em proteínas utilizou-se fator de conversão de produtos lácteos (6,38). Utilizou-se 1 ml de amostra de leite humano para determinação do nitrogênio total.

### 4.3.2 Quantificação das proteínas pelo método do formol adaptado

Para a realização do método do formol em leite humano foi utilizado o método modificado com base no descrito por Costa Júnior (2020). Foi transferido para um béquer, 1 mL de leite e 1 gota de indicador fenolftaleína alcoólica 1%. Em seguida o conjunto foi titulado utilizando solução Dornic (hidróxido de sódio 0,111 mol/ L), até que tomasse uma coloração rosa claro. Após a titulação, foram acrescentados 0,2 mL de formol 37% p.a. e aguardou-se por 20 segundos em capela de exaustão de gases. Repetiu-se então a titulação com solução Dornic até que atingisse novamente a coloração rosa claro. Também foi calculado o Fator Acidez do Formol (FAF), que é o volume de solução Dornic gasto para titulação de 0,2 mL do formol 37% p.a. utilizado na técnica. O volume de solução Dornic gasto na segunda titulação da amostra, descontado o FAF, foi utilizado nos cálculos estatísticos para avaliar a correlação com Kjeldahl.

## 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos a teste de normalidade Shapiro-Wilk e as regressões lineares foram testadas quanto à significância e independência de resíduos a 95% de probabilidade pela ANOVA. Os parâmetros da regressão, bem como seus intervalos de confiança e coeficientes de correlação, foram estabelecidos. Foi utilizado o programa estatístico XLSTAT versão 2022.3.1.1320 (Addinsoft, Paris, França).

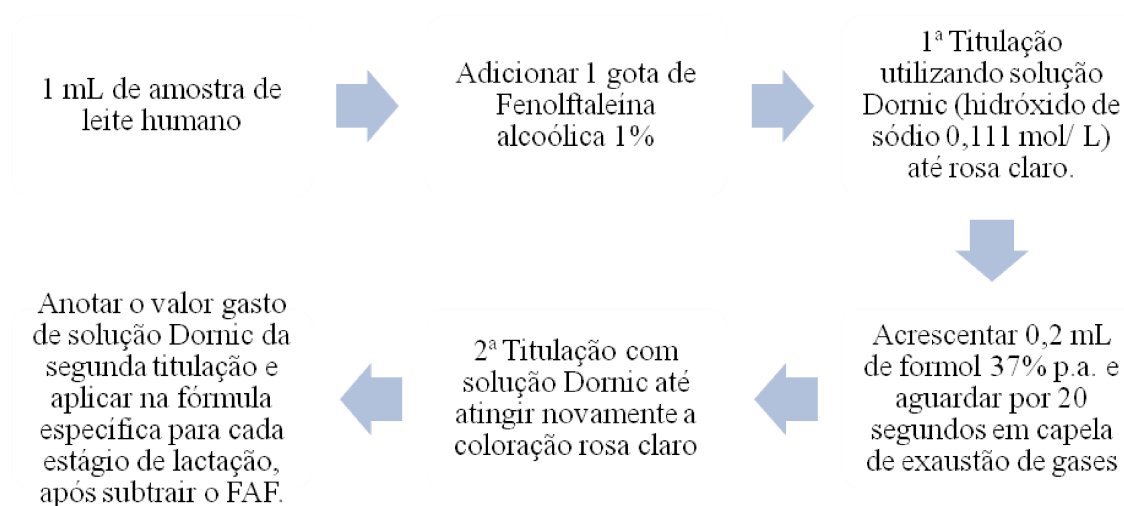
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RESULTADOS DAS FASES DOS PRÉ-TESTES

No primeiro momento foi realizada a determinação da quantificação da proteína de leite humano por kjeldahl e formol para avaliar se existiria correlação entre os métodos para essa matriz. Averiguada a existência da correlação foram realizados testes para miniaturização do método, troca de concentração de solução alcalina e a utilização do oxalato de potássio.

Com base nos resultados dos pré-testes, foi definida a metodologia de adaptação do método do formol a ser testada (Figura 1) para correlação com método de kjeldahl, sendo esta uma continuação da análise de acidez titulável do leite humano com 1 mL de amostra, solução básica de hidróxido de sódio 0,111 mol/ L (solução Dornic), sem utilização do oxalato de potássio.

Figura 2 – Representação esquemática do método do formol adaptado para determinação do teor de proteína em leite humano



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

As alterações entre o método de formol adaptado para leite humano, mediante ao método de formol tradicional para leite de vaca estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Diferença entre os parâmetros dos métodos de formol tradicional e adaptado para determinação de proteína

<b>Parâmetros do método</b>	<b>Determinação de proteína pelo método do Formol tradicional (COSTA JÚNIOR, 2020)</b>	<b>Determinação de proteína pelo método do Formol ADAPTADO</b>
Quantidade de amostra	10 mL	1 mL
Uso do oxalato de potássio 28%	0,4 mL	Não utiliza
Concentração da solução de hidróxido de sódio	0,1 mol/L	0,111 mol/L
Quantidade de fenolftaleína alcoólica 1%	1 mL	1 gota
Quantidade de formol 37% P.A. utilizado	2 mL	0,2 mL

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

É possível que o oxalato não tenha sido efetivo para a análise de leite humano, pela sua atuação nos fosfatos do leite (WOLLSCHOON-POMBO; VARGAS, 1977), uma vez que os fosfatos estão presentes majoritariamente nas caseínas (SILVA, 2004).

É importante ressaltar que as proteínas do leite humano são qualitativamente diferentes das do leite de vaca, onde a relação proteínas do soro/caseína no leite humano é aproximadamente 80/20, enquanto a no leite bovino é 20/80 (CALIL *et al.*, 2003).

## 5.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE LEITE HUMANO PELO MÉTODO DO FORMOL ADAPTADO E DE KJELDAHL

Ao analisarmos a tabela 2, podemos observar que as médias de mL Dornic no método formol adaptado para colostro e leite de transição apresentam semelhança, sendo  $P \geq 0,05$ ; para o método de kjeldahl observamos que para leite de transição e leite maduro as médias apresentaram semelhança, sendo  $P \geq 0,05$ .

Tabela 2 – Resultados do percentual de proteína obtidos para o método do Formol adaptado e Kjeldahl para leite humano em diferentes fases de lactação\*

Fases de lactação	mL Dornic** (formol adaptado)	% PB Kjeldahl
Colostro	0,17±0,06 <sup>a</sup>	3,95±1,52 <sup>a</sup>
Transição	0,12±0,05 <sup>ab</sup>	2,24±0,21 <sup>b</sup>
Maduro	0,09±0,03 <sup>b</sup>	1,65±0,33 <sup>b</sup>

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

\*Médias±desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias são semelhantes ( $P>0,05$ ) pelo teste de Tukey.

\*\* volume de solução Dornic (NaOH 0,111 mol/L) gasto na segunda titulação do método adaptado do formol, já descontado o fator acidez do formol, conforme descrito no item 4.3.2.

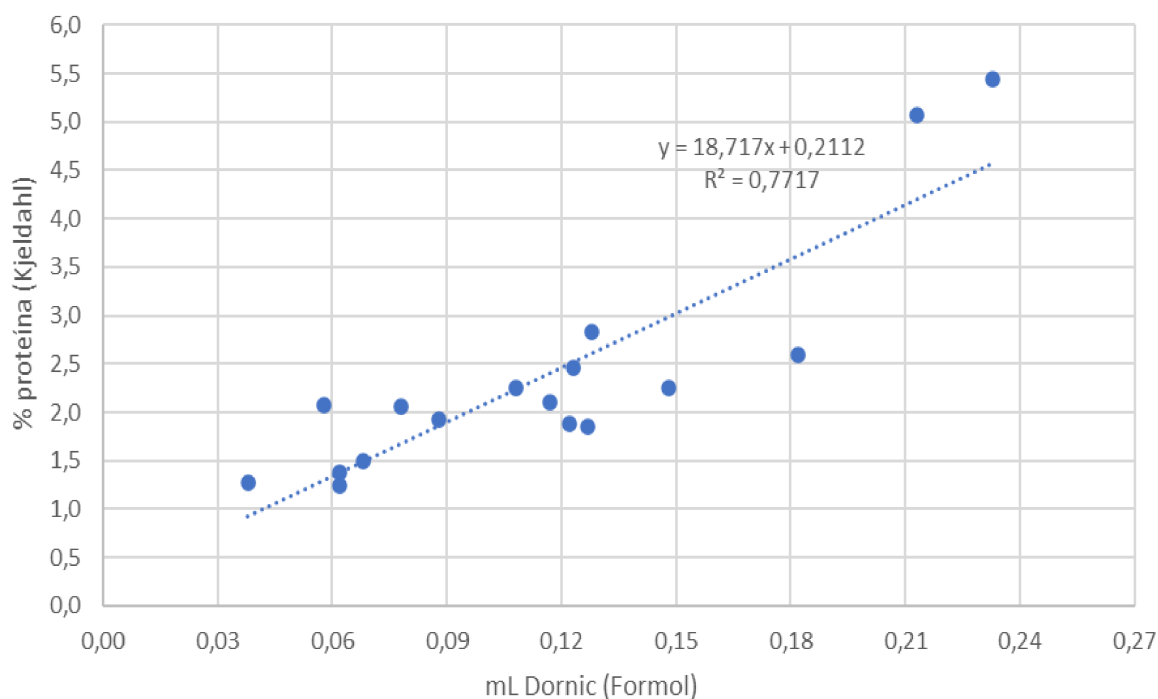
O resultado ratifica os achados analíticos e literários sobre o colostro ser um leite com maior teor de proteínas. O colostro é muito rico em fatores de defesa, como imunoglobulinas e substâncias imunomoduladoras, sendo as imunoglobulinas representantes da maior parte da fração protéica do colostro (CALIL *et al.*; 1992).

O leite de transição apresenta um teor de proteínas inferior ao colostro, o decréscimo ocorre em virtude da diminuição progressiva das imunoglobulinas (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2018). Já o leite maduro apresenta menor quantidade de proteínas, quando comparado ao colostro e ao leite de transição, pois o foco na produção de proteínas é acompanhar o crescimento e desenvolvimento do lactente (ANDREAS *et al.*, 2015).

### 5.3 CORRELAÇÃO DOS MÉTODOS CONSIDERANDO CONCOMITANTEMENTE TODOS OS ESTÁGIOS DE LACTAÇÃO DO LEITE HUMANO

Para estabelecer uma correlação entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado (conforme descrito no item 4.3.2) e a proteína obtida para todas as amostras disponíveis (em todos os estágios de lactação) pelo método de Kjeldahl, foi estabelecida uma regressão entre os dados (Figura 3) com significância comprovada pela ANOVA (Tabela 3).

Figura 3 - Regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano em todos os estágios de lactação



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 3 – ANOVA da regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano em todos os estágios de lactação

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	17,0573	17,0573	50,70664	3,5E-06	
Resíduo	15	5,045878	0,336392			
Total	16	22,10318				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,21115	0,333408	0,633308	0,53607	-0,49949	0,921793
mL Dornic	18,71734	2,628523	7,120859	3,5E-06	13,11478	24,31991

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Ao analisarmos a Tabela 3, observamos que a regressão foi significativa, mas a intercessão não apresentou significância, sendo, portanto, dispensável na fórmula. Dessa

forma, pode ser estabelecida uma fórmula que correlaciona o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado (descontado o FAF) e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano em **todos os estágios de lactação**:

$$\% \text{ Proteína} = 18,7 \times \text{mL Dornic.}$$

Onde a porcentagem é expressa em m/v e mL Dornic é o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado já descontado o FAF.

De acordo com Pyne (1932) citado por Wolfschoon-Pombo e Vargas (1997), o percentual de proteína calculada pelo método de formol tradicional em leite de vaca está expresso na seguinte fórmula: % proteína = 1,74 x Valor de Formaldeído.

Resultado semelhante sobre correlação dos métodos analíticos de kjeldahl e formol para quantificação de proteínas foi encontrado em um estudo realizado por Olegário *et al* (2008), em ricota probiótica, cujo objetivo foi evidenciar a viabilidade do uso do método de formol como uma alternativa ao método oficial de kjeldahl. Ao realizar a comparação utilizando como base suas médias de resultados para formol e kjeldahl, pôde-se evidenciar que o objetivo das análises foi atingido satisfatoriamente em ambos os métodos, sendo, portanto, viável a utilização do método de formol como alternativa ao kjeldahl.

Em outro estudo comparativo entre resultados obtidos no método do formol e em kjeldahl realizado por Lourenço e Wolfschoon-Pombo (1982), onde se avaliou o teor de caseína em leite destinado à fabricação de queijo prato, observou-se que os métodos não apresentaram diferença significativa através de análise estatística. Sendo, portanto, viável a utilização do método de formol.

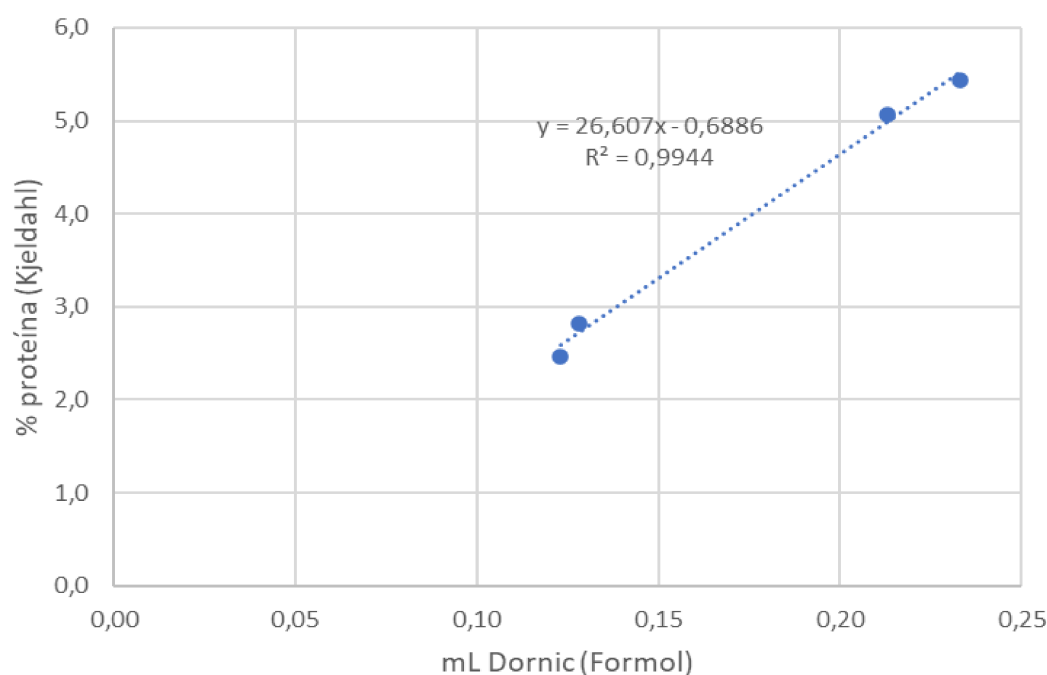
Em importante estudo sobre métodos analíticos para determinação de proteína por kjeldahl e formol, em leite pasteurizado e cru, realizado por Wolfschoon-Pombo e Vargas (1997), apontou a eficácia do método de formol para determinação de proteína no leite.

#### 5.4 CORRELAÇÃO DOS MÉTODOS CONSIDERANDO O ESTÁGIO DE LACTAÇÃO “COLOSTRO” DO LEITE HUMANO

Para estabelecer uma correlação entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado (conforme descrito no item 5.3.2) e

a proteína obtida para colostro pelo método de Kjeldahl, foi estabelecida uma regressão entre os dados (Figura 4) com significância comprovada pela ANOVA (Tabela 4).

Figura 4- Regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de colostro



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 4 - ANOVA da regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de colostro

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	6,880276788	6,880277	352,0666	0,002828327	
Resíduo	2	0,03908509	0,019543			
Total	3	6,919361878				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-0,688578741	0,256787734	-2,68151	0,115475	-1,793447185	0,416289703
FORMOL (mL)						
Colostro	26,60711273	1,418029793	18,76344	0,002828	20,50582297	32,70840249

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Ao analisarmos a Tabela 4, observamos que a regressão foi significativa, mas a interseção não apresentou significância, sendo, portanto, dispensável na fórmula. Dessa forma, pode ser estabelecida uma fórmula que correlaciona o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado (descontado o FAF) e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de **colostro**:

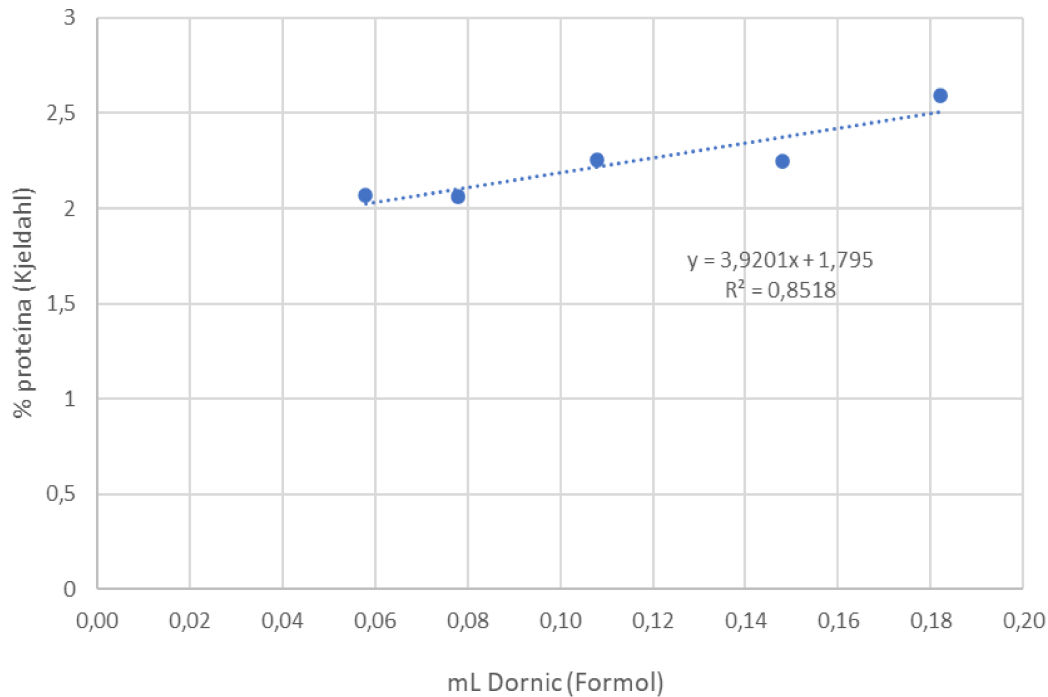
$$\% \text{ Proteína} = 26,6 \times \text{mL Dornic.}$$

Onde a porcentagem é expressa em m/v e mL Dornic é o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado já descontado o FAF.

#### 5.5 CORRELAÇÃO DOS MÉTODOS CONSIDERANDO O ESTÁGIO DE LACTAÇÃO “TRANSIÇÃO” DO LEITE HUMANO

Para estabelecer uma correlação entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado (conforme descrito no item 5.3.2) e a proteína obtida para leite de transição pelo método de Kjeldahl, foi estabelecida uma regressão entre os dados (Figura 6) com significância comprovada pela ANOVA (Tabela 5).

Figura 5- Regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano de transição



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 5 - ANOVA da regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano de transição

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,157434	0,157434	17,24825	0,025374526	
Resíduo	3	0,027383	0,009128			
Total	4	0,184816				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	1,794999	0,116479	15,41055	0,000594	1,424312454	2,165686042
FORMOL (mL) Transição	3,9201	0,943897	4,153102	0,025375	0,916198824	6,92400172

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Ao analisarmos a Tabela 5, observamos que a regressão foi significativa. Dessa forma, pode ser estabelecida uma fórmula que correlaciona o volume de solução de NaOH 0,111

mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado (descontado o FAF) e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de **leite humano de transição**:

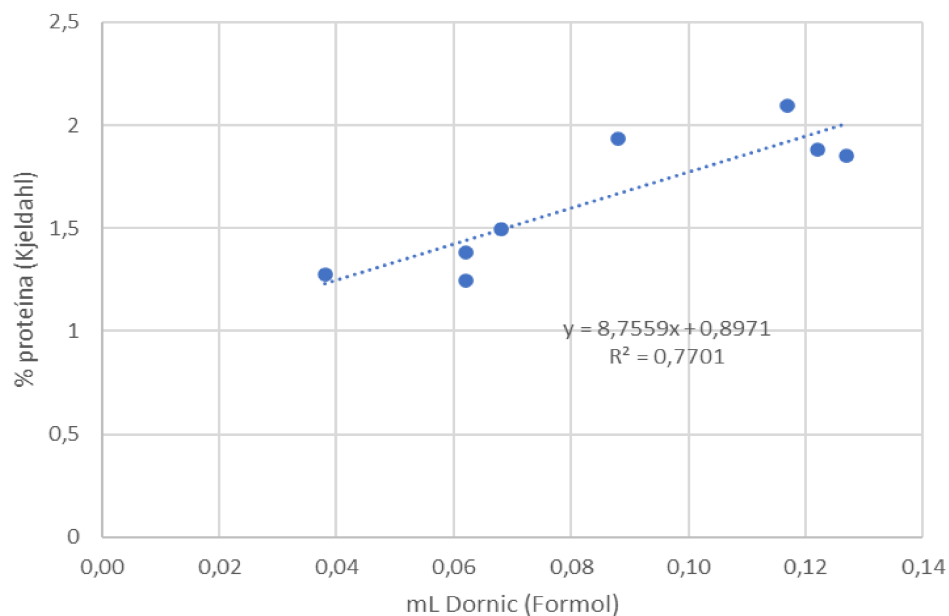
$$\% \text{ Proteína} = 3,92 \times \text{mL Dornic} + 1,79.$$

Onde a porcentagem é expressa em m/v e mL Dornic é o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado já descontado o FAF.

## 5.6 CORRELAÇÃO DOS MÉTODOS CONSIDERANDO O ESTÁGIO DE LACTAÇÃO “MADURO” DO LEITE HUMANO

Para estabelecer uma correlação entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado (conforme descrito no item 5.3.2) e a proteína obtida para leite humano maduro pelo método de Kjeldahl, foi estabelecida uma regressão entre os dados (Figura 5) com significância comprovada pela ANOVA (Tabela 6).

Figura 5 - Regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano maduro.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 6 - ANOVA da regressão linear entre o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de leite humano maduro

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,59186	0,59186	20,09449	0,00418	
Resíduo	6	0,176723	0,029454			
Total	7	0,768583				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,897118	0,177686	5,048901	0,002336	0,462337	1,3319
FORMOL (mL) maduro	8,7559	1,95327	4,482688	0,00418	3,976421	13,53538

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Ao analisarmos a Tabela 6, observamos que a regressão foi significativa. Dessa forma, pode ser estabelecida uma fórmula que correlaciona o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado (descontado o FAF) e a proteína pelo método de Kjeldahl para as amostras de **leite humano maduro**:

$$\% \text{ Proteína} = 8,76 \times \text{mL Dornic} + 0,897.$$

Onde a porcentagem é expressa em m/v e mL Dornic é o volume de solução de NaOH 0,111 mol/L gasto na segunda titulação do método do formol adaptado já descontado o FAF.

## 5.7 RESUMO DAS FÓRMULAS DE CORRELAÇÃO ENTRE O MÉTODO DO FORMOL ADAPTADO E KJELDAHL PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA EM LEITE HUMANO

As fórmulas encontradas (Tabela 7) foram distintas para os diferentes estágios de lactação possivelmente pela diferença dos tipos e quantidade de proteínas encontradas em cada estágio da lactação, o que o que pode ter interferido na correlação com o método de Kjeldahl.

A Tabela 7 - Apresenta um resumo das fórmulas de correlação entre o método do formol adaptado e kjeldahl para determinação de proteína em leite humano

Estágio de Lactação	Fórmula para % de proteína usando o método do formol adaptado	R <sup>2</sup> das regressões
Todos	% Proteína = $18,7 \times \text{mL Dornic}$ .	0,7717
Colostro	% Proteína = $26,6 \times \text{mL Dornic}$ .	0,9944
Transição	% Proteína = $3,92 \times \text{mL Dornic} + 1,79$ .	0,8518
Maduro	% Proteína = $8,76 \times \text{mL Dornic} + 0,897$ .	0,7701

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Por outro lado, fica complexo estabelecer uma diferença perfeita entre as fases de lactação do leite humano, pois as variáveis são extensas. De acordo com Calil e Falcão (2003) ocorrem modificações na composição do leite humano de acordo com o tempo de lactação e elas vêm de encontro às necessidades do lactante, dessa forma, os diferentes estágios de lactação são estabelecidos em média, sendo o colostro o que sofre maiores variações.

Outro ponto importante é que o leite de mães de recém-nascidos prematuros apresenta composição protéica diferente do das mães de bebês a termo (BRASIL, 2009). Neste estudo não obtivemos as informações do tempo pós-parto das amostras, o que pode ser um fator determinante para conhecermos as características do leite humano estudado.

É importante ressaltar que para melhor a aplicabilidade do método, uma fórmula global estabelecida com um número maior de amostras e que contemple o leite dos vários estágios de lactação é preferível às fórmulas que consideram os estágios de lactação do leite humano isoladamente, pois vários fatores podem interferir na aplicabilidade da fórmula para algumas amostras individuais. Dessa forma, uma fórmula que apresenta significância estatística comprovada para um grupo de amostras mais heterogêneo pode diminuir o erro no resultado relacionado a fatores aleatórios interferentes em amostras individuais.

## 6 CONCLUSÃO

Variados estudos sobre a aplicação do método de formol como alternativa ao método de kjeldahl vêm sendo difundidos. A utilização do método do formol possui uma correlação interessante com o método de kjeldahl em estudos apresentados, que apontam com segurança que este método é preciso na quantificação de proteína em diferentes tipos de amostras.

Nesta proposta, o método de formol adaptado mostra-se adequado e de grande relevância para análise de proteína em leite humano. Apresenta rápida execução e aplicabilidade, comparando-o com o de referência. O método do formol adaptado neste proposto estudo apresenta simplicidade e pode ser de fácil incorporação na rotina dos laboratórios dos bancos de leite sem consumo extra de amostras e sem a necessidade da utilização de equipamentos elaborados para sua execução, visto que é a continuidade da análise de acidez (Dornic). Além disso, nos resultados obtidos neste trabalho, o método do formol adaptado apresentou significância na correlação com o método de kjeldahl, para os diferentes estágios de lactação.

É importante destacar que para melhor aplicar os resultados após a técnica do formol adaptado, uma fórmula global estabelecida é preferível às fórmulas que consideram os estágios de lactação do leite humano isoladamente. Embora necessite de ajustes e aprimoramento no controle sobre as variáveis que permearam o experimento, o método do formol adaptado apresentou confiabilidade nos resultados apresentados.

No entanto, se fazem necessários mais estudos com maior número amostral para validação do método do formol adaptado.

## REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C.; LACERDA, A.M.A. *Nutrição em Obstetrícia e Pediatria*. 2ª edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2009.
- AKRÉ, J.(ed.). **Alimentação infantil: bases fisiológicas**. São Paulo: IBFAN Brasil: Instituto de Saúde; 1997. Disponível: <http://www.ibfan.org.br/documentos/ibfan/doc-288.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2020.
- ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R. O leite humano: qualidade e controle. In: SANTOS JR. (Org.). **Fisiologia e Patologia da Lactação**. Natal: Sociedade Brasileira de Mastologia, 1995.
- ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R.; GUIMARÃES, V. Leite Humano Ordenhado: Determinação da Acidez Titulável – Método Dornic. Nov 2021. **BLH-IFF/NT-** 29.11. Disponível em:[https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/79/nt\\_29.11\\_determinacao\\_acidez\\_lho.pdf](https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/79/nt_29.11_determinacao_acidez_lho.pdf). Acesso em: 18 fev. 2022.
- ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R.; GUIMARÃES, V. Leite Humano Ordenhado: Determinação do Crematócrito. Nov 2021. **BLH-IFF/NT-** 30.11. Disponível em: [https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/79/nt\\_30.11\\_determinacao\\_crematocrito\\_lho.pdf](https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/79/nt_30.11_determinacao_crematocrito_lho.pdf). Acesso em: 27 maio.2022.
- ALMEIDA, J.A.G. **Amamentação: um híbrido natureza-cultura**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1999. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/rdm32/pdf/almeida-9788575412503.pdf>. Acesso em: 27. Fev. 2020.
- ANDREAS, N., KAMPMANN, B., MEHRING LE-DOARE, K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**. 91(11), 629-635. (2015).
- BARROS, M. S.; ALMEIDA, J. A.; RABUFFETTI, A. Rede brasileira de bancos de leite humano: uma rede baseada na confiança. **Reciis – Rev Eletron ComunInfl Nov Saúde**. 2018 abr. jun. 12(2). p. 125-33.
- BEZERRA, R. T. R.; FURTADO, Marco Antonio Moreira; SILVA, Paulo Henrique F.; AZEVEDO, Marco Antonio. Avaliação da Influência da Temperatura de Aquecimento sobre a Determinação do Teor de Caseína no Leite. **Hígia. Revista de Ciências da Saúde e Sociais aplicadas do Oeste Baiano**. Disponível em: <http://www.fasb.edu.br/revista/index.php/ideia/article/viewFile/47/30>. Acesso em 04-maio-2022.
- BLESA M; SULLIVAN G; ANBLAGAN D.; TELFORD E. J.; *et al*. Early breast milk exposure modifies brain connectivity in preterm infants. **Neuroimage**. 2019 Jan 1;184:431-439.
- BOCCOLINI, C. S.; BOCCOLINI, P. M. M.; MONTEIRO, F. R.; VENÂNCIO, S. I.; GIUGLIANI, E. R. J. Tendência de indicadores do aleitamento materno no Brasil em três décadas. **Rev. Saúde Pública**. Vol. 51. Num. 108. 2017.

BORGO, L. A.; RAMOS, K. L.; ALMEIDA, S. G.; SEIDE, L. O.; OLIVEIRA, L. A.; ARAUJO, W. M. Avaliação do funcionamento e identificação de pontos críticos de controle, em bancos de leite humano do Distrito Federal. **Hig. Aliment.** mar. 2005; 19(129):43-6.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde da criança: nutrição infantil, aleitamento materno e alimentação complementar.** Disponível em: <http://www.facene.com.br/wp-content/uploads/2010/11/A-import%C3%A2ncia-dos-Bancos-de-Leite-.pdf>. Acesso em: 09. Fev. 2020.

BRASIL. **Lei nº 8.069**, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o estatuto da criança e do adolescente. Brasília: Presidência da República. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/18069.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/18069.htm). Acesso em: 07 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 239, p. 8, 14 dez. 2006.

BRASIL. Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 set.2006.

BRAVI, F.; WIENS F.; DECARLI, A. D. A. L.; PONT, A.; AGOSTONI, C., FERRARONI, M. Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: a systematic review. **Am J Clin Nutr.** 2016 Sep;104(3):646-62.

BRUXEL, R.; SICA, C. Análise de proteína e micronutrientes em amostras de leite humano. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo. v. 13. n. 78. p.194-201. Mar./Abril. 2019.

CALIL, V. M. L. T.; FALCÃO, M. C. Human milk composition: the ideal nutrition for infants. **Rev Med.** São Paulo. 82(1-4):1-10. 2003 jan.-dez.

CALIL, V. M. L. T.; LEONE, C. R.; RAMOS, J. L. A. Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II - Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca. **Pediatria.** Num. 14. p.14-23. 1992.

CAVALCANTE, J. L. P.; TELLES, F. J. S.; PEIXOTO M. M. L. V.; RODRIGUES, R. de C. de B. **Uso da acidez titulável no controle de qualidade do leite humano ordenhado.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 25(1): 103-108, jan.-mar. 2005

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de Alimentos.** 2. ed. Campinas: Unicamp, 2003. 207p.

CHRISTIAN P.; SMITH E.R.; LEE S.E.; VARGAS A.J.; BREMER, A.A., RAITEN, D.J. The need to study human milk as a biological system. **Am J Clin Nutr.** 2021 May 8;113(5):1063-1072.

COSTA JÚNIOR, L. C. G. **\*Métodos físico-químicos para controle de qualidade em leite e produtos lácteos.\*** 1ª. ed. Juiz de Fora: Ed. do Autor, 2020. E-book. 681 p.

COSTA, A. G. V.; SABARENSE, C. M. Modulation and composition of fatty acids in human Milk. **Rev. Nutrição**. Campinas, 23(3):445-457, maio/jun., 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rn/v23n3/12.pdf>. Acesso em: 07. Mar.2020.

COUTINHO, Stephania de F. et al. Educação para a saúde: promotores de aleitamento. **Ciência ET Praxis**. 12 (24), 2019. p. 29-36. Disponível em: <https://revista.uemg.br/index.php/praxys/article/view/4299>. Acesso em: 09 ago 2022.

DANTAS, M. E. B. S.; AUGUSTO, E. O.; BOTELHO, I. S.. Análise do controle de qualidade do leite doado para o banco de leite humano da FSCM-PA. **Rev. Para. Med.** v. 20, n. 4. Belém, dez. 2006.

Disponível em [http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-59072006000400015&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-59072006000400015&lng=pt&nrm=iso) . Acessos em: 09. mar. 2020.

DOMELLÖF, M., LÖNNERDAL, B., DEWEY, K.G., COHEN, R.J., HERNELL, O. Iron, zinc, and copper concentrations in breast milk are independent of maternal mineral status. **Am J Clin Nutr.** 2004 Jan;79, (1):111-5.

DONOVAN, S.M. Human Milk Proteins: Composition and Physiological Significance. **Nestle Nutr Inst Workshop Set.** 2019;90, p. 93-101.

ERICK, M. Breast milk is conditionally perfect. **Med Hypotheses.** 2018 Feb;111:82-89.

FIOCRUZ (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ). **Programa Nacional de Qualidade em Bancos de Leite Humano.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.

GARWOLIŃSKA, D.; NAMIEŚNIK, J.; KOT-WASIK, A.; HEWELT-BELKA, W. Chemistry of Human Breast Milk. A Comprehensive Review of the Composition and Role of Milk Metabolites in Child Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 2018, 66, 45, p. 11881–11896

GOMES, J. C.; OLIVEIRA, G. F. **Análises Físico-Químicas de Alimentos.** Viçosa: Editora UFV. 2011.

GUERRA, A.; RÊGO, C., SILVA, D.; FERREIRA, G. C.; MANSILHA, H.; ANTUNES, H., & FERREIRA, R. Alimentação e nutrição do lactente.; **Revista de Medicina da Criança e do Adolescente.** Set/Out de 2012, p. Suplemento II. 2; White, R. e Allen, R. A literature review of the nutrient composition on human breast milk. **Diet and Nutrition Survey of Infants and Young Children.** 2011.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). Dietary reference intakes: applications in dietary planning. Washington (DC): **National Academy Press.** 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 2019, mai; p. 123-124.

MAIA, P. R. S. *et al.* Bases conceituais para uma estratégia de gestão: o caso da

Rede Nacional de Bancos de Leite Humano. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n.6, nov./ dez. 2004.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. ; RAYMOND, J.L. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 14<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. 1228 p

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde da criança: Nutrição Infantil Aleitamento Materno e Alimentação Complementar. **Caderno de Atenção Básica**, nº 23. Brasília, 2009.

MONTAGNE, P. M.; CUILLIÈRE, M. L.; MOLÉ, C. M.; BÉNÉ, M. C.; FAURE, G. C. DynamicsoftheMainImmunologicallyand Nutritionally AvailableProteinsofHuman Milk during Lactantion. **JournalofFoodCompositionandAnalysis**. 2000, 13:127-137.

MORGANO, M. A.; SOUZA, L. A.; NETO, J. M.; RONDÓ, P.H. C. Composição mineral do leite materno de bancos de leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. Campinas, 25(4): 819-824, out.-dez. 2005.

NASCIMENTO, M. B. R.; ISSLER, H. Breastfeeding: Makingth edifference in the Desenvolviment, Health and Nutrition of Termand Preterm Newborns, **Revistado Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, 2003, 58(1): 49 –60.

NOVAES, J. F.; LAMOUNIER, J.A.; FRANCESCHINI, S. C. C.; PRIORE, S. E. Effects of breastfeeding on children’s health in the short and long run. Nutrire: **Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 34, n. 2, p. 139-160, ago. 2009. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1519-8928/2009/v34n2/a139-160.pdf>. Acesso em: 27.fev.2020.

OLIVEIRA, K. M. G.; SEGHETO, L.; FURTADO, M. A. M. Estudo comparativo entre os métodos do Formol e de Kjeldahl para determinação de proteínas em leite. Anais do XXIII Congresso Nacional de Laticínios. 06 nº 351. vol. 351 Juiz de Fora. p 196. Jul/Ag. 2006.

OMS Informação disponível em: <https://rblh.fiocruz.br/rblh-na-54a-assembleia-mundial-da-saude-2001>. Acesso em: 07 ago. 2021.

SILVA, P.H.F. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação do teor de caseína em leite e para avaliação de proteólise em queijos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

SILVA, P.H.F. ; PEREIRA, D.B.C. ; OLIVEIRA, L.L. ; COSTA JUNIOR, L.C.G. **Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos**. Juiz de Fora: Oficina de impressão, 1997.

SILVA, R. K. C.; SOUZA, N. L.; SILVA, R. A. R.; SILVA, J. B.; LADISLÁO, N. B. P. R.; OLIVEIRA, S. I. M. O ganho de peso em prematuros relacionado ao tipo de leite. **Rev.Eletr. Enf. [Internet]**. V. 16, Nº 3, p.535-41; 2014 jul/set. Disponível em: <https://www.fen.ufg.br/revista/v16/n3/pdf/v16n3a06.pdf>. Acesso em: 27. Fev. 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. **Aleitamento materno: Prevalência e práticas de aleitamento materno em crianças brasileiras menores de 2 anos** 4: ENANI

2019. - Documento eletrônico. - Rio de Janeiro, RJ: UFRJ, 2021. Disponível em: <https://enani.nutricao.ufrj.br/index.php/relatorios/>. Acesso em 07 ago. 2022.

VIEIRA, A. A.; MOREIRA, M. E. L.; ROCHA, A. D.; PIMENTA, H. P.; LUCENA, S. L. Assessment of the energy content of human milk administered to very low birth weight infants. **Jornal de Pediatria** - Vol. 80, Nº6, 2004.

VIEIRA, A. F. CASTAGNARA, D. D.; DAL ZOTTO, C. S. M; FRAPORTI, L.; MALAGUEZ, E. G.; HOCH, G. C. **Metodologias para determinação de nitrogênio**. 2016. Disponível em: <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/91099>. Acesso em: 10 ago. 2022.

WOLFSCHOON, F. A.; LEITE, A. E. A Titulação de formol: Método rápido para determinação de proteínas no soro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 193,1977.

WOLFSCHOON, A. F.; VARGAS, O. L. Aplicação do método de formol para determinação de proteína no leite cru e pasteurizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 1977, jul-Ago 32(192): 3-137.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. **Global Breastfeeding Scorecard, 2019**: Increasing commitment to breastfeeding through funding and improved policies and programmes. World Health Organization, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Collaborative Study Team on the Role of Breastfeeding on the Prevention of Infant Mortality. Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. **Lancet**. Vol. 355. p. 451-455. 2000.