



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA**

MARCIO ANTÔNIO MENDONÇA

**FÓRMULAS INFANTIS PARA LACTENTES: PERFIL LIPÍDICO E
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DOS GLÓBULOS DE GORDURA**

**BRASÍLIA
2016**

MARCIO ANTÔNIO MENDONÇA

**FÓRMULAS INFANTIS PARA LACTENTES: PERFIL LIPÍDICO E
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DOS GLÓBULOS DE GORDURA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Nutrição Humana.

Orientadora: Professora Dra. Wilma Maria Coelho Araújo

**BRASÍLIA
2016**

Mendonça, Marcio Antônio.

Fórmulas infantis para lactentes: perfil lipídico e características físicas dos glóbulos de gordura / Marcio Antônio Mendonça. 86f.: il

Orientadora Professora Dra. Wilma Maria Coelho Araújo

Tese de Doutorado/Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana
da Universidade de Brasília. Brasília, 2016.

1. Fórmulas infantis para lactentes.
2. Lipídios totais.
3. Perfil de ácidos graxos.
4. Diâmetro dos glóbulos de gordura.
5. Ácido linoleico.
6. Ácido linolênico.



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA**

BANCA EXAMINADORA

**Professora Doutora Wilma Maria Coelho Araújo
(Presidente)**

**Professor Doutor Ernandes Rodrigues Alencar
(Examinador)**

**Professora Doutora Raquel Braz Assunção Botelho
(Examinadora)**

**Professora Doutora Marileusa Dosolina Chiarello
(Examinadora)**

**Professora Doutora Maria Hosana Conceição
(Examinadora)**

**Professor Doutor Luiz Antônio Borgo
(Suplente)**

DEDICATÓRIA

À memória de meu pai, Antônio Mendonça, pelo sonho de me ver continuar os estudos, qualificando-me em minha profissão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé, coragem, perseverança e o dom da fortaleza que me concedeu e por abençoar-me todos os dias da minha vida.

À minha esposa Sandra, pelo amor, compreensão, renúncia de seus planos pessoais em prol do meu doutorado e pela ajuda constante a mim dispensada.

Aos meus filhos João Pedro e Ana Luíza, pelo carinho e compreensão. E pela ajuda na tabulação dos dados.

À minha mãe Aparecida, meu irmão Marco Aurélio e todos familiares, pela constante oração, apoio e estímulo para a realização deste trabalho.

A minha orientadora, Prof. Dra. Wilma Maria Coelho Araújo, pelo carinho e atenção, não medindo esforços na ajuda constante para a elaboração deste trabalho.

Ao Professor Dr. Luiz Antônio Borgo, pelo companheirismo e incentivo na realização deste trabalho e pela disponibilidade contínua em ajudar, esclarecer e aprofundar meus conhecimentos na área escolhida.

Ao Prof. Dr. Ernandes Rodrigues Alencar, pela valiosa e constante ajuda, pela paciência e pela disponibilidade com que me transmitiu os seus conhecimentos, para a realização deste trabalho.

Ao Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB) pela doação das amostras de fórmulas infantis para esta pesquisa e à nutricionista Ioná Irber, pela disponibilidade em ajudar.

Ao Hospital Universitário de Brasília (HUB) pela doação das amostras de leite humano, em especial ao nutricionista responsável pelo banco de leite, Carlos Henrique, pela disponibilidade e atenção a mim dispensada.

Ao Laboratório Multiusuário da Central Analítica do Instituto de Química-UnB, em especial ao Prof. Dr. Fernando Sodré pela receptividade no laboratório e pela

disponibilização dos equipamentos. Aos químicos: Arilson Lehmkuhl , Luiz Eduardo Celino Benedito e Alan Mól pela constante ajuda com seus conhecimentos técnicos. Aos estagiários Artur Moraes de Amorim e Bruno Gastão pela colaboração na operacionalização do cromatógrafo.

Ao Laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia – UnB, em especial à professora Sônia Nair Bão pela disponibilização do laboratório e de todos os equipamentos e materiais necessários na realização das análises de microscopia eletrônica envolvidas neste trabalho, bem como toda sua equipe técnica: à técnica do laboratório Ingrid Gracielle, à doutoranda Márcia Cristina, Iasmim, Ana Brígida, Misléia Rodrigues, Marina Arantes e Diogo Loiola, pela ajuda e descontrações nas horas de intenso trabalho.

Ao Departamento de Nutrição, professores, funcionários e colegas do Doutorado em Nutrição Humana da UnB, pelo convívio e pela troca de conhecimentos, que contribuíram para a realização deste curso.

Aos alunos de PIBIC: Juliana Malafaia, Filipe R. Marques, Rayan Silva e Arthur Araújo pela ajuda valiosa no preparo das amostras e na realização das análises físico-químicas no Laboratório de Análises de Alimentos da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV).

À Rosa Maria de Deus de Souza, Frederico Lopes, pela ajuda no laboratório, pela amizade, palavras de ânimo, conforto, otimismo e cumplicidade.

Ao colega de trabalho da secretaria da FAV – UnB, Guilherme Antônio Soares Queiroz, pela ajuda nos esclarecimentos de informática e pela gentileza em prestar informações administrativas.

Aos amigos pessoais da caminhada cristã, pela constante oração, incentivo e torcida para o bom êxito deste trabalho.

RESUMO

Os lipídios do leite humano se destacam pelas inúmeras funções nutricionais e fisiológicas que favorecem o desenvolvimento do lactente. Este nutriente contém mais de 200 ácidos graxos, com um perfil caracterizado pela menor concentração de ácidos graxos saturados, maior teor dos ácidos oleico e linoleico, e fontes de ácidos graxos poli-insaturados. Essa composição aliada à organização e a constituição da membrana do glóbulo de gordura fazem com que o leite humano seja o alimento ideal para os lactentes. Contudo, situações como a de lactentes prematuros, ou ainda aquelas em que há a contra-indicação da amamentação, determinam a necessidade do uso de fórmulas infantis como um completo ou substituto parcial do leite humano. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil lipídico e o diâmetro dos glóbulos de gordura de fórmulas infantis para lactentes. Foram coletadas amostras 10 fórmulas infantis para lactentes, de três diferentes lotes, utilizadas como substituto ao leite humano no Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB), totalizando 30 amostras. A amostra de leite humano foi constituída por um *pool* de amostras de 10 doadoras de leite maduro proveniente do banco de leite do Hospital Universitário de Brasília (HUB), que foi utilizado como padrão. Os lipídios totais foram quantificados pelo método butirométrico de Gerber – Van Gulik. Os lipídios das fórmulas infantis para lactentes foram extraídos pelo método de Bligh & Dyer. A esterificação foi realizada segundo Christie, 1989. A análise dos ácidos graxos esterificados foi realizada no cromatógrafo gasoso CG-2010 Shimadzu com detector MS-QP2010 Plus, com autoinjeter AOC-5000. A separação dos ácidos graxos foi feita utilizando a Coluna J & W Scientific 122-2362 DB-23, 60m (comprimento), 0.25 mm ID (diâmetro interno), 0.25 μ m (espessura do filme). As condições cromatográficas foram: temperatura do injetor modo split, 260 °C; temperatura inicial da coluna 140 °C por 5 minutos, programada para aumentar em 2 °C a cada minuto até atingir 240 °C, no final dos 56 minutos da corrida cromatográfica. Como gás de arraste foi utilizado o hélio, com vazão de 0,40 ml/minuto. A temperatura do detector foi de 260 °C. O volume injetado foi de 1 μ L. A identificação dos ácidos graxos foi feita por comparação com o tempo de retenção do padrão de ácidos graxos Supelco 37 component FAME mix (Supelco®, USA). Para determinar o diâmetro dos glóbulos de gordura foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados foram expressos em percentual em relação à área dos ácidos graxos totais. Os dados obtidos nessa pesquisa revelaram diferenças significativas entre as fórmulas infantis para lactentes e o leite humano, e entre as fórmulas infantis analisadas, com relação ao percentual de lipídios totais e ao perfil de ácidos graxos, exceto para as frações de ácido linoleico e de ácido linolênico. Com relação ao diâmetro dos glóbulos de gordura das fórmulas infantis para lactentes, excetuando-se uma amostra, todas elas diferiram significativamente com relação ao leite humano.

Palavras-chaves: Fórmulas infantis para lactentes. Lipídios totais. Perfil de ácidos graxos. Diâmetro dos glóbulos de gordura. Ácido linoleico. Ácido linolênico.

ABSTRACT

The human milk lipids are highlighted by the numerous nutritional and physiological functions that favor the development of the infant. This nutrient contains more than 200 fatty acids, with a profile characterized by a lower concentration of saturated fatty acids, higher content of oleic and linoleic acids, and sources of polyunsaturated fatty acids. This composition together with the organization and the formation of the fat globule membrane make human milk the ideal food for breastfeeding's. However, situations such as premature infants, or those in which there is breastfeeding contraindication determine the necessity of the use of infant formula as a partial or complete substitute for human milk. The aim of this study was to determine the lipid profile and the diameter of the infant formula for infant's fat globules. Were collected ten samples of infant formulas for infants of three different batches, used as a substitute for human milk in the and Child Hospital of Brasília (HMIB), totaling 30 samples. The human milk sample consisted of a pool of samples from ten donors mature milk from the milk bank at the University Hospital of Brasilia (HUB), which was used as standard. The total lipids were quantified by butyrometer method of Gerber - Van Gulik. Lipids of infant formula were extracted by Bligh & Dyer method. The esterification was carried out according to Christie,1989. The analysis of the esterified fatty acids was performed on gas chromatograph Shimadzu GC-2010 with MS-QP2010 Plus detector with auto injector AOC-5000. The separation of fatty acids was performed using J & W Scientific Column 122-2362 DB-23. Established chromatographic conditions were: split mode 260 °C, initial column temperature 140 °C for 5 minutes, programmed to increase at 2 °C every minute until reaching 240 °C at the end of the 56 minutes from the chromatographic run. As a carrier gas was used helium with a flow rate of 0.40 mL / minute. The detector temperature was 260 °C. The volume injected was 1µL. As the carrier gas used was helium, with continuous flow column of 0.40 ml / min. The volume injected was 1µL. The identification of each fatty acid was made by comparison with the standard retention time of fatty acids Supelco component 37 FAME mix (Supelco®, USA). To determine the diameter of fat globules was used the technique of scanning electron microscopy. The results were expressed as percentage of the area of each fatty acid in relation to the area of total fatty acids. The data obtained in this study revealed significant differences between infant formula and human milk, and between infant formulas analyzed with respect to the percentage of total lipids and fatty acid profile, except for the fractions of linoleic acid and acid linolenic. With respect to the diameter of the fat globules in infant formula, except for one sample, all they differed significantly with respect to human milk.

Keywords: Infant formula for breastfeeding's. Total lipids. Fatty acid profile. Diameter of the fat globules. Linoleic acid. Linolenic acid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** As famílias dos ácidos graxos poli-insaturados **06**
- Figura 2:** Organização da membrana do glóbulo de gordura do leite **13**
- Figura 3:** Esquema básico de um cromatógrafo gasoso - MS **3 2**
- Figura 4:** Esquema do detector massas, quadrupolo com impacto de elétrons **3 3**
- Figura 5:** Esquema básico do funcionamento do MEV **3 5**
- Figura 6:** Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura da fórmula infantil das amostras de fórmulas infantis FIP (a), leite humano (b), FIPIS (c) e FIPSLPH (d) **4 9**
- Figura 7:** Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura da fórmula infantil das amostras de fórmulas infantis FIR (a), FIEAPG (b), FIASPLVM (c), FIIL (d) e FIPEH (e) **5 0**
- Figura 8:** Diâmetro numérico médio (μm) dos glóbulos de gordura das fórmulas infantis e do leite humano **5 1**

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1: Composição em ácidos graxos dos leites bovino e humano em g/100g de gordura	07
Tabela 2: Principais classes de lipídios do leite humano em diferentes períodos de lactação	08
Tabela 3: Composição de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados do leite humano em diferentes países	11
Quadro 1: Definição e parâmetros para a fração lipídica de fórmulas infantis, segundo a legislação vigente no Brasil (RDC n.º 43/2011, RDC n.º 44/2011, RDC n.º 45/2011)	19,20
Tabela 4: Informações declaradas na rotulagem das fórmulas infantis para lactentes analisadas	25,26
Tabela 5: Teor de lipídios expressos em g/100ml e g/100kcal em fórmulas infantis para lactentes e no leite humano	41
Tabela 6: Percentual de ácidos graxos saturados em fórmulas infantis para lactentes e no leite humano	42
Tabela 7: Percentual de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados em fórmulas infantis para lactentes e no leite humano	44
Tabela 8: Perfil lipídico das fórmulas infantis e respectivos valores percentuais de ácidos graxos dos óleos indicados na lista de fontes lipídicas das fórmulas infantis para lactentes analisadas	45,46
Tabela 9: Características físicas dos glóbulos de gordura das fórmulas infantis e do leite humano	47

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AAL	Ácido Alfa Linolênico
AAP	American Academy of Pediatrics
AGE	Ácidos graxos essenciais
AGM	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
AL	Ácido linoleico ω -6
ALA	Ácido linolênico ω -3
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
AO	Ácido oleico ω -9
ARA	Ácido araquidônico
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CG	Cromatografia Gasosa
d	Dias pós-parto
\bar{D}	Diâmetro Numérico Médio
D _{3,2}	Diâmetro de Sauter ou Diâmetro Superficial Médio
D _{4,3}	Diâmetro de Brouckere ou Diâmetro Volumétrico Médio
DEL	Diferentes estágios de lactação
DHA	Ácido docosaheptaenoico
D _{max}	Diâmetro Máximo
D _{min}	Diâmetro Mínimo
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ESPGHAN	European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition
FIASPLVM	Fórmula infantil elementar para alergia severa a proteínas do leite de vaca e a múltiplos alimentos
FIEAPG	Fórmula infantil espessada com amido pré-gelatinizado
FIIL	Fórmula infantil isenta de lactose
FIP	Fórmula infantil de partida
FIPEH	Fórmula infantil à base de proteína extensamente hidrolisada do

	soro do leite
FIPIS	Fórmula infantil à base de proteína isolada de soja
FIPRNBP	Fórmula infantil para prematuros e recém-nascidos de baixo peso
FIPSLPH	Fórmula infantil à base de proteínas de soro de leite parcialmente hidrolisadas
FIR	Fórmula infantil de rotina
FIS	Fórmula infantil de seguimento
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMIB	Hospital Materno Infantil de Brasília
HTLV	Vírus Linfotrófico de Células Humanas
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IQ	Instituto de Química
LCPUFA	Ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MGGL	Membrana do glóbulo de gordura do leite
MSM	Esfingomiéline do leite
n	Tamanho amostral
ND	Não demonstrado no estudo
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG2	Prostaglandinas da série 2
PI	Fosfatidilinositol
PS	Fosfatidilserina
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TCM	Triglicerídios de cadeia média
UnB	Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Lipídios do leite humano	03
2.2. Fórmula infantil para lactente	15
3. HIPÓTESE	22
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo geral	23
4.2. Objetivos específicos	23
5. MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1. Amostras	24
5.2. Análises químicas	27
5.2.1 Quantificação de Lipídios Totais	27
5.2.2 Extração de lipídios totais pelo método Bligh Dyer	28
5.2.3 Esterificação (metilação) dos ácidos graxos	29
5.2.4 Análise cromatográfica dos ácidos graxos esterificados	31
5.2.5 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
5.3 Tratamento Estatístico	38
6. RESULTADOS	39
7. DISCUSSÃO	52
8. CONCLUSÕES	64
9. REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	73
Anexo A1 a A14 – Cromatogramas	73
Anexo B – Certificado de Aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisas	87
Anexo C1 a C9 - Micrografias e histogramas de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura das fórmulas infantis e do leite humano	88

1. INTRODUÇÃO

Os lipídios do leite humano se destacam pelas inúmeras funções nutricionais e fisiológicas que favorecem o desenvolvimento do lactente. Cerca de 98% dos lipídios totais no leite humano estão como ésteres de triglicerídios, e 90% destes são ácidos graxos. Assim, os ácidos graxos esterificados correspondem a 88% da fração lipídica.

Esses nutrientes contêm mais de 200 ácidos graxos, e, comparativamente ao leite bovino, contêm menor concentração de ácidos graxos saturados, maior teor dos ácidos oleico e linoleico, pequena quantidade de outros poli-insaturados e menor atividade hipercolesterolêmica. São fontes de ácidos graxos poli-insaturados – incluindo os ácidos linoleico n-6 (18:2n-6) e α -linolênico n-3 (18:3n-3), ambos essenciais, e seus derivados 20:4n-6, 20:5n-3, e 22:6n-3, necessários às inúmeras funções fisiológicas (BELDA; POURCHET-CAMPOS, 1991; JENSEN, 1999; SINCLAIR, 2000; McMANAMAN & NEVILLE, 2003; von SCHACKY, 2004).

O conteúdo total de lipídios e a composição de ácidos graxos são variáveis, sendo a adiposidade, a duração do período de lactação, o estágio de lactação, a idade materna fatores de modulação positiva, enquanto a desnutrição materna, infecções, distúrbios metabólicos, medicamentos são considerado fatores negativos de modulação, além de fatores genéticos, hábitos alimentares, dieta materna, idade gestacional, hormônios, paridade, variação diária entre as lactações (COSTA & SABARENSE, 2010).

Pesquisas recentes mostram, ainda, que não apenas o perfil de ácidos graxos, mas também a composição e a organização das membranas dos glóbulos de gordura do leite humano desempenham papel relevante na digestão e absorção de nutrientes, com preservação de propriedades funcionais únicas, que promovem o desenvolvimento do lactente, incluindo a proteção imunológica (GARCIA & INNIS, 2013).

Contudo, situações específicas como a de lactentes prematuros ou aquelas em que há a contraindicação da amamentação – infecção materna pelo vírus HIV, HTLV (Vírus Linfotrófico Humano de Células T), citomegalovírus, herpes simples ou herpes-zoster, varicela, hepatite C, hanseníase, doença de Chagas, entre muitas

outras, determinam a necessidade da suplementação alimentar de lactentes, em complementação ou em substituição ao leite humano (COSTA & GOTLIEB, 1998; FERREIRA, 1990; HYLANDER, et al., 1996).

Nessas situações, a alternativa segura se concretiza no uso de fórmulas infantis para lactentes, que se caracterizam como um alimento para uso dietético especial exclusivo para lactentes, devido à sua composição similar a do leite humano, ou a sua adequação como um completo ou substituto parcial do leite materno (INFANT NUTRITION AND FEEDING, 2009).

Nas últimas décadas, muitas pesquisas foram desenvolvidas pelos fabricantes de fórmulas infantis na busca de encontrar formulações equilibradas nutricionalmente e semelhantes ao leite humano, especialmente quanto à relação entre os ácidos graxos n-6 (C18:2 – linoleico) e n-3 (C18:3 – linolênico) (INFANT NUTRITION AND FEEDING, 2009; CARVER, 2003; STRAARUP *et al.*, 2006). Isto porque os ácidos graxos essenciais (AGE) compõem uma classe de moléculas que não podem ser sintetizadas pelo organismo, devido à carência de enzimas dessaturases e hidrogenases (KOLETZKO et al, 2003; SILVA et al, 2007b).

Apesar do avanço no processo tecnológico, essas fórmulas ainda apresentam grandes diferenças na composição quando comparadas ao leite humano (CARVER; 2003). Os principais ácidos graxos presentes nos óleos vegetais são os ácidos oleico (AO), linoleico (AL) e linolênico (ALA), mas a presença desses nutrientes nas fórmulas infantis não assegura a ingestão adequada do ácido α -linolênico e dos derivados dos ácidos graxos de cadeia longa (EPA, DHA e ARA).

As fórmulas infantis, líquidas ou em pó, são, geralmente, produtos à base de leite de vaca ou de outros animais, ou de uma mistura destes e/ou de outros ingredientes comprovadamente adequados para alimentação de lactentes e crianças de primeira infância. Assim, estão agrupadas como: Fórmula infantil para lactentes e de seguimento para lactentes e; Fórmula infantil para lactentes à base de leite de vaca – se o leite de vaca for a única fonte de proteínas, e Fórmula infantil para lactentes à base de soja – se a soja for a única fonte de proteína.

Considerando os recentes avanços sobre o entendimento da MGGL do leite humano e o fato de que as fórmulas infantis para lactentes são constituídas por uma mistura de ingredientes de origem animal e/ou vegetal com o objetivo de mimetizar a

composição química do leite humano maduro, torna-se também fundamental aprofundar o conhecimento científico de tais diferenças que levam a distintas alterações na digestão e absorção dos lipídios do leite.

Em razão da existência de estudos consistentes que indicam que a fração lipídica das fórmulas infantis para lactentes desempenham papel relevante no desenvolvimento dos lactentes, por seu valor nutricional e fisiológico, esta pesquisa teve como objetivo caracterizar o perfil de ácidos graxos e determinar o diâmetro dos glóbulos de gordura em fórmulas infantis para lactentes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lipídios do leite humano

O leite humano é indiscutivelmente o alimento que reúne as características físico-químicas e nutricionais adequadas ao lactente, além de inúmeras vantagens imunológicas e psicológicas, atuando também na melhoria do processo digestivo, no sistema gastrointestinal, na diminuição da morbidade e mortalidade infantis. É consensual a importância do aleitamento materno exclusivo, principalmente nos primeiros 6 meses de vida do lactente (BUTTE *et al.*, 1984; GIUGLIANI & VICTORIA, 1997; MARQUES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007 (a)).

Nos Estados Unidos, a *American Academy of Pediatrics* (AAP) recomenda o aleitamento materno no 1º ano de vida do lactente a termo e reconhece os benefícios do leite humano no manejo de lactentes prematuros. No Brasil, ao final da década de 1970, se retomou o estímulo ao aleitamento materno, na busca de uma nutrição adequada e a consequente diminuição da mortalidade infantil (LAMOUNIER *et al.*, 2001; MARTINS, 2001).

Entre os macronutrientes, os lipídios do leite materno se destacam pelas inúmeras funções nutricionais e fisiológicas que favorecem o desenvolvimento do lactente. Cerca de 98% dos lipídios totais no leite humano estão como ésteres de triglicerídios, e 90% destes são ácidos graxos. Assim, os ácidos graxos esterificados correspondem a 88% da fração lipídica. O restante da fração lipídica é constituído por fosfolipídios (0,8%), colesterol (0,5%); vitaminas lipossolúveis; 50% do valor

calórico total do leite humano são provenientes dos lipídios (KOLETZKO *et al.*, 2001; LIRA, 2002; JENSEN, 1999).

O leite humano é, portanto, um fluido muito complexo no qual as moléculas de carboidratos e de alguns sais minerais estão em solução verdadeira; a caseína se encontra em uma fase dispersa, coloidal; as moléculas de lipídios apresentam-se na forma de glóbulos, de cerca de 4 μm de diâmetro, emulsificados na fase aquosa (SILVA *et al.*, 2005; SILVA (a) *et al.*, 2007).

A manutenção dessa emulsão se deve à formação de camadas bipolares de fosfolipídios, proteínas, mucopolissacarídeos, organizadas de modo a constituírem a membrana do glóbulo de gordura do leite, com área superficial suficientemente grande ($500\text{cm}^2/\text{mL}$) que permite a adesão de enzimas lipolíticas e de outros componentes.

Os lipídios do leite humano contêm mais de 200 ácidos graxos e, comparativamente ao leite bovino, contêm menor concentração de ácidos graxos saturados, maior teor dos ácidos oleico e linoleico, pequena quantidade de outros poli-insaturados e menor atividade hipercolesterolêmica. Os ácidos graxos são monocarboxílicos, alifáticos (cadeia aberta), saturados ou insaturados. Neste último caso, podem apresentar uma ou várias insaturações e isomeria geométrica *cis*, como em todas as gorduras dietéticas, ou *trans*, comum no leite e carne de ruminantes e em gorduras parcialmente hidrogenadas. São solúveis em solventes orgânicos apolares, característica resultante da sua fração hidrofóbica (cadeia hidrocarbonada) (BORGIO, 2011).

A denominação dos ácidos graxos segue, normalmente, a nomenclatura clássica da química orgânica; o carbono 1 é aquele que faz parte do grupo funcional (grupamento carboxila). Para o ácido palmítico, a nomenclatura é 16:0; para o oleico, 18:1; e para o linoleico, 18:2. Nessa nomenclatura, 16 e 18 se referem ao número de átomos de carbono na cadeia; 0, 1 e 2 indicam, respectivamente, o número de ligações duplas em cada caso. Assim, a posição da ligação dupla é dada pelo número indicado entre parênteses, a partir da função orgânica: 18:1 (9), 18:2 (9,12) (JENSEN, *et al.*, 1995).

Na década de 1980, pesquisas identificaram novas inter-relações entre as estruturas e os efeitos biológicos dos ácidos graxos de modo que, do ponto de vista

bioquímico, era mais importante notar o que ocorria proximamente ao grupo final da cadeia carbônica (grupamento metila) do que no grupo inicial (carboxila). Assim, foi proposto que a numeração dos carbonos da cadeia ocorresse a partir do grupamento metila terminal, ou carbono ômega (ω), que representa a última letra do alfabeto grego. Portanto, se a primeira ligação dupla ocorresse entre os carbonos 3 e 4 (a partir de ômega) o composto seria um ω -3; se ocorresse entre os carbonos 6 e 7, um ω -6; se entre os carbonos 9 e 10, um ω -9 (BELDA; POURCHET-CAMPOS, 1991). Segundo Jensen *et al.* (1995), a letra *n* é preferível à ômega, que prevalece na literatura mais antiga. Desse modo, 18:2(9,12) torna-se 18:2 n-6.

A síntese de ácidos graxos insaturados ocorre a partir dos saturados por um processo enzimático catalisado por dessaturases, no fígado. No caso dos animais, que possuem apenas a dessaturase delta-9, somente são sintetizados o ácido oleico e sua família n-9. Desse modo, o ácido α -linolênico (AAL), precursor da família dos AGPI n-3, e o ácido linoleico (AL), precursor dos AGPI n-6, que representam, respectivamente, as famílias n-3 e n-6, são considerados essenciais. A partir do n-3, por alongação e dessaturação (Figura 1), são sintetizados os ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) e docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3), necessários para a higidez das membranas biológicas, para a retina, córtex cerebral, tecido nervoso, testículos e plaquetas sanguíneas (STANNER, 2000).

O ácido araquidônico (ARA) é o metabólito mais importante do ácido linoleico nos tecidos animais, tanto do ponto de vista quantitativo quanto biológico. Geralmente, ele é o ácido graxo poli-insaturado mais abundante na fração de fosfolipídios e precursor de várias famílias de eicosanoides, como as prostaglandinas da série 2 (PG₂), tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas (mediadores anti-inflamatórios) (CHRISTIE, 1989, 2010).

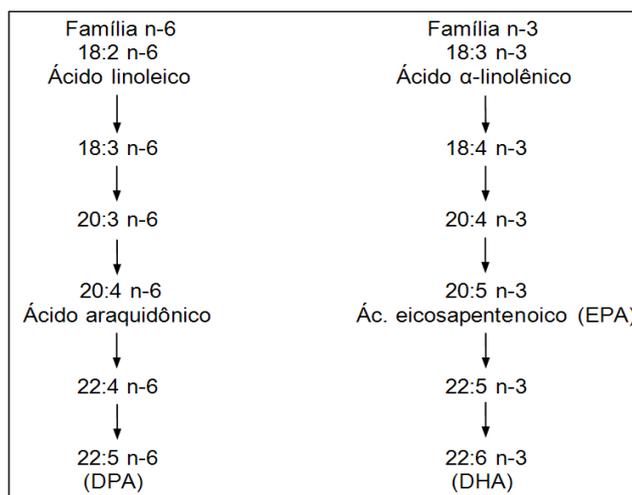


Figura 1: As famílias dos ácidos graxos poli-insaturados (STANNER, 2000)

O EPA é um dos mais importantes ácidos graxos na família n-3. É um constituinte dos fosfolipídios nos tecidos animais, especialmente do cérebro, e é precursor da série PG₃. De acordo com Christie (2010), há grande interesse sobre o papel desse nutriente nos distúrbios neurológicos, como a esquizofrenia.

O DHA é o ponto final do metabolismo do ácido linolênico nos tecidos animais. Também é um constituinte dos fosfolipídios animais; neurônios e retina, particularmente, possuem alta concentração desse ácido. Sua concentração nos tecidos tem sido correlacionada com várias doenças; é essencial para muitas funções neurológicas e, juntamente com o colesterol, pode atuar como modulador da estrutura e função das membranas (CHRISTIE, 2010).

Estudos mostraram que esses dois ácidos graxos incorporam-se ao tecido adiposo, sendo eliminados pela glândula mamária (BELDA & POURCHET-CAMPOS, 1991). Providencialmente, o leite humano é fonte de ácidos graxos n-3 e n-6; no entanto, sua concentração depende da quantidade ingerida pela mãe.

Os lipídios do leite humano são, portanto, fontes de ácidos graxos poli-insaturados – incluindo os ácidos linoleico n-6 (18:2n-6) e o α-linolênico n-3 (18:3n-3), ambos essenciais, e seus derivados 20:4n-6, 20:5n-3, e 22:6n-3, necessários às inúmeras funções fisiológicas descritas anteriormente (BELDA; POURCHET-CAMPOS, 1991; JENSEN, 1999; SINCLAIR, 2000; McMANAMAN & NEVILLE, 2003; von SCHACKY, 2004) (Tabela 1).

O conteúdo total de lipídios e a composição de ácidos graxos do leite humano são variáveis, sendo a adiposidade, a duração do período de lactação, o estágio de lactação, a idade materna fatores de modulação positiva, enquanto a desnutrição materna, infecções, distúrbios metabólicos, medicamentos são considerado fatores negativos de modulação, além de fatores genéticos, hábitos alimentares, dieta materna, idade gestacional, hormônios, paridade, variação diária entre as lactações (COSTA & SABARENSE, 2010).

Pesquisa realizada com 34 mulheres, com um período de lactação maior que um ano e 27 mulheres com período de lactação de dois a seis meses, estimaram o conteúdo de gordura do leite humano e os resultados indicaram uma correlação positiva e significativa entre os níveis de gordura e o conteúdo de energia com o período de amamentação superior a um ano. Contudo, a análise de regressão multivariada mostrou que os teores de gordura e de energia não foram influenciados pela idade materna, dieta e índice de massa corporal (MANDEL *et al.*, 2005).

Tabela 1: Composição em ácidos graxos dos leites bovino e humano em g/100g de gordura (JENSEN *et al.*, 1990)

Ácido Graxo	Bovino	Humano
Butírico (C4:0)	3,3	-
Caproico (C6:0)	1,6	Traços
Caprílico (C8:0)	1,3	Traços
Cáprico (C10:0)	3,0	1,3
Laúrico (C12:0)	3,1	3,1
Mirístico (C14:0)	14,2	5,1
Pentadecanóico (C15:0)	1,3	Traços até 0,4
Palmítico (C16:0)	42,7	20,2
Palmitoléico (C16:1; 9c)	3,7	5,7
Esteárico (C18:0)	5,7	6,0
Oléico (C18:1; 9c)	16,7	46,4
Linoléico (C18:2; 9,12cc)	1,6	13,0
Linolênico (C18:3; 9,12,15ccc)	1,8	1,4
Total de saturados	76,2	36,1
Hipercolesterolênicos	61,3	28,8

A fase de lactação (colostro, leite de transição e leite maduro) influencia o conteúdo total de lipídios (JENSEN, 1999; YAMAWAKI et al., 2005) (Tabela 2). Os triacilgliceróis são os componentes mais abundantes e não sofrem grandes alterações entre as fases de lactação; entretanto, os fosfolipídios e o colesterol podem sofrer variações de mais de 50% e 60%, respectivamente, no primeiro trimestre de lactação. Sobre o conteúdo de esteróis do leite humano, valores em torno de 10 mg/dL a 20 mg/dL, quando comparado ao leite de vaca, são considerados elevados; o colesterol é a fração preponderante (90% aproximadamente) (JENSEN, 1999; EUCLYDES, 2000). A elevada ingestão de colesterol pelo recém-nascido, comparada à ingestão do adulto, tem sido sugerida como um fator benéfico, uma vez que o colesterol está envolvido na síntese de mielina, indispensável para o desenvolvimento do sistema nervoso central, além de ser utilizado para a produção de ácidos biliares e hormônios (COSTA & SABARENSE, 2010).

Tabela 2: Principais classes de lipídios do leite humano em diferentes períodos de lactação

Classe de Lipídeo		Porcentagem de lipídeos ao longo da lactação				
		Colostro (3 dias)	Transição (7 dias)	Maduro (21 dias)	Maduro (42 dias)	Maduro (84 dias)
Lipídeos totais	%*	2,04	2,89	3,45	3,19	4,87
Colesterol (%)	%**	1,30	0,70	0,50	0,50	0,40
	g/dL	34,50	20,20	17,30	17,30	19,50
Fosfolipídeos	%**	1,10	0,80	0,80	0,60	0,60
Triacilglicerol	%**	97,60	98,50	98,70	98,90	99,00

* Porcentagem no leite (g/dL). ** Teor expresso em peso%, em relação ao conteúdo total de lipídeos.

Fonte: COSTA & SABARENSE (2010), adaptado de JENSEN (1999).

Estudo realizado no Japão com 1.197 nutrízes em diferentes estágios de lactação mostrou (1 a 365 dias pós-parto) que o teor lipídico aumentou durante os estágios de lactação, sendo encontrado em maior teor no período de 11 a 20 dias (3,90g/dL) e 21 a 89 dias (3,75g/dL), apresentando diferença em relação ao colostro (2,68g/dL), ao leite de transição (2,77g/dL), ao leite maduro de 90 a 180 dias (3,20g/dL) e ao leite maduro de 181 a 365 dias (3,17g/dL). Mas, não foram

encontradas diferenças entre as estações do ano e nem entre as regiões dos indivíduos (COSTA & SABARENSE, 2010). Adicionalmente, as quantidades relatadas nesse estudo corroboram com os dados da Tabela 2, exceto para o leite maduro de 84 dias.

É possível que a alimentação materna seja o principal fator que modula o perfil de ácidos graxos do leite humano. Estudos realizados em diferentes regiões geográficas mostraram variação na composição lipídica; pesquisa realizada no leite de mulheres italianas identificou altos níveis de monoinsaturados, indicando que o hábito alimentar mediterrâneo, rico em ácidos graxos monoinsaturados e baixo consumo de ácidos graxos saturados, influenciou essa resposta (COSTA & SABARENSE, 2010).

Apesar de alguns estudos mostrarem que o poder socioeconômico pode determinar mudanças no comportamento alimentar que levam a alterações na composição lipídica do leite de nutrizes, Jensen (1999); Hayat et al (1999); Bener et al (2001); Cunha et al (2005); Silva et al (2005) e Koletzko et al (2001) relataram que, em estudos com isótopos estáveis, a maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados não é oriunda da alimentação materna, mas do metabolismo lipídico dos estoques corporais maternos. Segundo esses autores, do total de ácido linoleico excretado no leite humano, 70% originam-se de depósitos corporais e 30% são oriundos da alimentação materna, assim como os diferentes graus de oxidação dos ácidos graxos estocados no tecido materno (COSTA & SABARENSE, 2010).

Um estudo de revisão realizado por Costa & Sabarense (2010) relatou as variações obtidas em pesquisas realizadas em diferentes países sobre o teor de ácidos graxos do leite materno (Tabela 3). Os resultados mostraram uma variação importante quanto ao teor total de ácidos graxos saturados (AGS). Os dados obtidos para a fração de ácido palmítico (C16:0) no leite materno sugerem que esse nutriente garante maior digestibilidade, facilita seu uso como fonte energética, gera outros ácidos graxos ou pode ser estocado pelo recém-nascido.

Aproximadamente 60% do total de ácido palmítico (C16:0) encontrado no leite ocupa a posição sn-2 do triacilglicerol, o que garante maior facilidade na absorção (KOLETZKO *et al.*, 2001). Tal fato se deve à maior polaridade e solubilidade em água do monoacilglicerol com o ácido palmítico na posição sn-2 em relação à sua

forma livre (LÓPEZ-LÓPEZ et al, 2001). Foram detectados níveis inferiores, em relação ao ácido palmítico, para o ácido esteárico (C18:0). No tecido humano, esse nutriente é rapidamente convertido em ácido oleico (C18:1) (COSTA & SABARENSE, 2010).

Quanto ao teor dos ácidos graxos monoinsaturados (AGM), não foram identificadas grandes diferenças. Os menores teores foram encontrados nos estudos conduzidos no Brasil e no Caribe, enquanto os maiores teores foram obtidos em pesquisas realizadas na Espanha e no Canadá. O ácido oleico (C18:1) foi o nutriente presente em maior quantidade em todos os estudos apresentados, variando entre 25,00% e 34,50% do total da fração lipídica. Esses ácidos graxos são utilizados pelo lactente como fonte energética e para compor a estrutura de membrana, além de auxiliarem na manutenção da viscosidade e fluidez da porção lipídica do leite humano devido à dupla ligação de suas moléculas (JENSEN, 1999; GIOVANNINI et al, 1991). Com relação ao conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, observa-se na Tabela 3 que os ácidos linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) foram os que estiveram presentes em maior concentração, variando entre 8,43% e 20,62% e 0,47% e 1,72%, respectivamente. Quanto à relação n-6/n-3, somente os estudos desenvolvidos na Austrália, Canadá, Alemanha, Brasil, Cunha et al, (2005) e Caribe apresentaram uma relação adequada de n-6/n-3, que, segundo Simopoulos, (2002), é de 5:1 a 10:1.

Tabela 3: Composição de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados do leite humano em diferentes países

País	Espanha	Áustria	Canadá	Alemanha	França	Argentina	Brasil	Brasil	Cuba	Caribe
N	19	69	103	38	10	21	77			
Períodos (dias)	15-30	60	60	30	DEL	30-90	15			
Unidade	Peso (%)	Peso (%)	%	%		Peso (%)	Peso (%)	Peso (%)	%	mol (%)
C8:0	ND	ND	ND	ND	0,19	ND	0,11	0,20	0,17	0,67
C10:0	ND	1,23	0,60	1,01	1,23	0,91	1,35	1,68	1,57	3,62
C12:0	ND	5,24	4,10	5,21	5,15	4,67	5,30	6,88	7,81	13,82
C14:0	ND	7,43	6,10	6,90	6,93	6,02	5,64	7,02	8,97	11,54
C16:0	21,08	25,14	19,40	22,47	21,74	20,58	19,21	17,30	19,39	20,89
C18:0	7,62	9,14	7,40	7,40	7,64	9,78	7,94	5,43	4,62	5,45
C20:0	ND	0,71	ND	ND	0,22	0,26	0,28	0,12	ND	ND
C21:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:0	ND	0,07	0,10	ND	ND	0,05	0,13	ND	ND	0,07
ΣAGS	28,70	48,96	37,70	48,99	43,10	42,27	39,96	38,63	42,53	56,06
C16:1	ND	2,62	0,30	ND	2,15	3,22	2,45	1,99	4,07	2,58
C18:1	34,50	31,40	33,90	31,50	32,10	33,40	30,10	25,00	29,70	21,40
C20:1	ND	0,27	ND	ND	0,78	0,08	0,60	0,26	0,51	0,38
ΣAGMI	34,5	34,29	34,2	31,5	35,03	36,7	33,15	27,25	34,28	24,36
C18:2	15,93	8,43	12,10	11,33	14,67	16,61	20,62	20,30	19,37	11,26
C18:3	0,49	0,69	1,40	0,90	0,70	0,47	1,72	1,43	0,92	0,67
ΣAGPI	16,42	9,12	13,5	12,23	15,37	17,08	22,34	21,73	20,29	11,93

n: tamanho amostral; d: dias pós-parto; DEL: diferentes estágios de lactação; ND: não demonstrado no estudo; Σ: Somatório; AGS: ácidos graxos saturados; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; ácidos graxos poli-insaturados.

Fonte: COSTA & SABARENSE (2010), com adaptações.

Este indicador (n-6/n-3) é muito importante, pois se sabe que as séries de ácidos graxos (n-3, n-6, n-7 e n-9) competem entre si pelas vias metabólicas de alongamento e dessaturação e tal harmonia é relevante para o adequado funcionamento do organismo (CALDER, 2001). Igualmente, foram detectadas as presenças do ácido araquidônico (C20:4n-6), metabólito do C18:2n-6, e do ácido eicosapentaenoico (EPA) (C20:5n-3) e docosahexaenoico (DHA) (C22:6n-3), metabólitos do C18:3n-3, especialmente nos estudos brasileiros (CUNHA et al, 2005).

Igualmente, a literatura destaca que a gordura do leite está presente na forma de glóbulos, constituídos por um núcleo, que é composto principalmente por triglicerídios, protegido por uma membrana lipoproteica, e a maioria dos ácidos graxos encontrados contém de 4 a 20 átomos de carbono em suas cadeias. Outros lipídios presentes incluem fosfolipídios, colesterol, ácidos graxos livres, mono e diglicerídios (COSTA et al 2009).

Apesar da variação observada para o teor de lipídios nas diferentes espécies mamíferas, todas elas secretam, de forma similar, os lipídios no leite por meio de estruturas únicas e altamente especializadas de glóbulos de gordura. Estes glóbulos são constituídos por um núcleo central que contém principalmente triacilgliceróis circundados por uma monocamada de lipídios polares, encapsulados em uma bicamada lipídica com uma superfície glicosilada conhecida como membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL) (Figura 2) (GARCIA & INNIS, 2013).

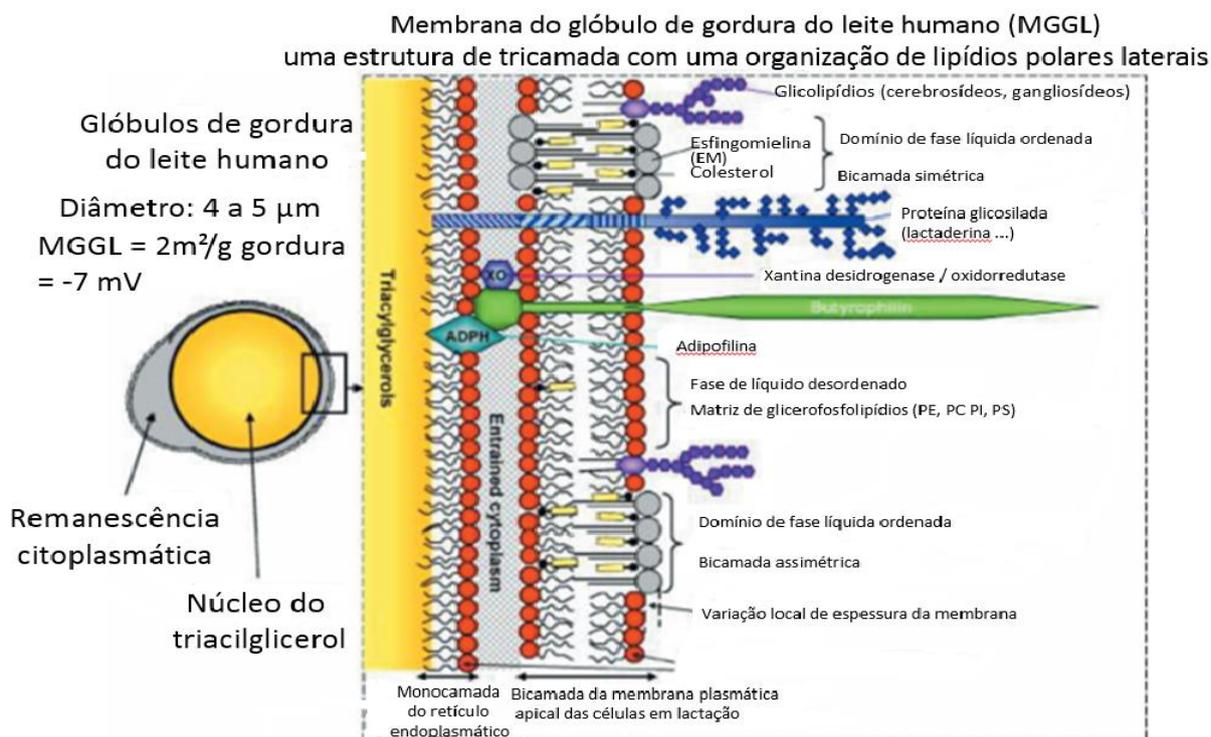


Figura 2. Organização da membrana do glóbulo de gordura do leite (GARCIA & INNIS, 2013).

A MGGL é composta por lipídios polares (fosfatidilcolina, PC; fosfatidiletanolamina, PE; fosfatidilinositol, PI; fosfatidilserina, PS; esfingomielina do leite, MSM; gangliosídeos, colesterol, proteínas e glicoproteínas (GALLIERA, et al, 2015). Assim, a MGGL é constituída por uma monocamada constituída de proteínas e lipídios polares com ácidos graxos na cauda em oposição ao núcleo do glóbulo, uma bicamada de lipídios polares, proteínas, glicoproteínas e colesterol, e uma ampla camada de citoplasma (10nm–20nm) entre a camada única e a bicamada externa.

A distribuição dos lipídios polares da MGGL é assimétrica, com fosfatidilcolina e esfingomielina localizadas na camada externa e fosfatidilcolina, fosfatidilinositol e fosfatidiletanolamina concentrados na superfície interna. A literatura relata a existência de heterogeneidade entre a composição e estrutura da MGGL entre glóbulos de gordura da mesma espécie e de espécies diferentes de leite (LOPEZ & MENARD, 2011). O diâmetro dos glóbulos de gorduras do leite humano são circundados pela MGGL, varia de $2,4\mu\text{m}$ a $10\mu\text{m}$, com uma área superficial de cerca

de $2\text{m}^2/\text{g}$ de gordura de leite (LOPEZ & MENARD, 2011). Gallier et al. (2015) relataram valores entre $0,1\mu\text{m}$ a $15\mu\text{m}$ para o tamanho dos glóbulos de gordura no leite humano, com um diâmetro entre $3\mu\text{m}$ e $5\mu\text{m}$.

Esta membrana do glóbulo de gordura é única para o leite das diversas espécies mamíferas e tem como função estabilizar o glóbulo de gordura do leite, numa emulsão óleo/água, além de fornecer importantes componentes que desempenham funções nutricionais e imunológicas para o lactente e para o microbioma intestinal, com crescente evidência de que os lipídios contribuem para a eficiência dos processos digestivos e para preservação da atividade biológica (GARCIA & INNIS, 2013).

A fração de lipídios polares (principalmente fosfolipídios e esfingolipídios) está positivamente relacionada com a área superficial da MGGL, e negativamente correlacionada com o diâmetro dos glóbulos no leite humano e bovino. De maneira geral, o teor de gordura do leite humano aumenta de $2\text{g}/100\text{mL}$ no colostro a $4\text{g}/100\text{mL}$ no leite maduro. Enquanto o teor absoluto de lipídios polares permanece constante, o percentual de glicerofosfolipídios e de esfingolipídios diminui de 1%, no colostro, para 0,3% - 0,5% no leite maduro, explicado principalmente pelo aumento duplo na fração de triacilgliceróis. O leite bovino tem em torno de $3,4\text{g}$ de lipídios e $0,2\text{mg}$ - $0,3\text{mg}$ de lipídios polares/100 mL, com muitas semelhanças quanto à estrutura do leite humano, mas com diferenças nos componentes individuais e suas proporções (GARCIA & INNIS, 2013).

No entanto, situações como a de lactentes prematuros, que podem ter seu estado nutricional afetado pelas características biológicas e sociais das mães; ou a de lactentes que podem apresentar situações fisiológicas que determinam a necessidade de uma alimentação específica; ou ainda situações de contra-indicação da amamentação, como a da infecção materna pelo vírus HIV, HLTV (Vírus Linfotrófico Humano de Células T), citomegalovírus, herpes simples ou herpes-zoster, varicela, hepatite C, hanseníase, doença de Chagas, entre muitas outras – determinam a necessidade da suplementação alimentar de lactentes, em complementação ou em substituição ao leite humano (COSTA & GOTLIEB, 1998; FERREIRA, 1990; HYLANDER, 1996).

A alternativa segura para tal complementação ou substituição do leite humano se concretiza no uso de fórmulas infantis para lactentes, que se caracterizam como um alimento para uso dietético especial exclusivo para lactentes, devido à sua composição similar a do leite humano, ou a sua adequação como um completo ou substituto parcial do leite materno (INFANT NUTRITION AND FEEDING, 2009).

2.2. Fórmula infantil para lactente

A descoberta, em 1838, na Alemanha, de que o leite bovino apresentava maior concentração de proteínas que o leite humano, impulsionou o desenvolvimento da alimentação artificial. Com isso, estratégias de evaporação e condensação de leites bovino e caprino foram desenvolvidas, obtendo-se como resultado um alimento estéril e de fácil conservação, quando métodos de refrigeração ainda não haviam sido desenvolvidos (REA, 1990). Em contrapartida, observava-se uma sucessão de diferenças significativas ao se comparar a composição química do leite materno com a do leite de vaca, que podiam trazer riscos para a saúde do lactente, como a deficiência de ácidos graxos essenciais, além, ainda, de conter quantidade elevada de proteínas com alto poder alergênico (AGOSTONI & HASCHKE, 2003).

O leite de vaca também demonstrava causar sangramento microscópico e perda de sangue no trato gastrointestinal quando administrado a lactentes nos primeiros seis meses, principalmente em lactentes pré-termo. Além disso, este tipo de leite podia fornecer baixo teor de ferro, ácido linoleico e vitamina E, e ingestão excessiva de sódio, potássio, cloreto e proteínas, alterando o estado nutricional de lactentes com efeito sobre o *status* de ferro (INFANT NUTRITION AND FEEDING, 2009).

Durante os séculos XIX e XX, o consumo de leites artificiais cresceu consideravelmente em decorrência da mudança do perfil das mulheres, que passaram a trabalhar fora do domicílio (CAMPOS et al., 2008). Pesquisas mostraram, entretanto, que lactentes e crianças que consumiam tais produtos apresentaram um desenvolvimento inferior ao de lactentes e crianças aleitadas pela mãe (BENSON & MASOR, 1994).

Os leites artificiais foram progressivamente desenvolvidos a partir do leite de outros mamíferos, por meio de numerosas modificações, até serem obtidas as atuais fórmulas infantis, tendo como base o conhecimento da composição química do leite humano e do leite de vaca. O primeiro “leite para lactentes” surgiu em 1867, desenvolvido por *Liebig* e produzido por *Henry Nestlé* (RADBILL, 1981; RÊGO et al, 2013).

Na década de 1950, estudos mostraram que os leites artificiais causavam alto potencial de sobrecarga de solutos para os rins, especialmente em crianças recém-nascidas, pelo risco de desenvolver desidratação hipernatrêmica (excesso de sódio no sangue) durante episódios de diarreia. O baixo conteúdo de ferro nas fórmulas e a alta ingestão de inibidores da absorção desse elemento foram responsáveis pela alta prevalência de deficiência de ferro. Avaliações apontavam ainda a baixa ingestão de ácidos graxos essenciais. Também na mesma década, uma alteração no método de evaporação resultou em decréscimo do conteúdo de vitamina B₆ (piridoxina) e repercussões metabólicas nos lactentes (FOMON, 1993).

A fórmula infantil passou a ser definida como um produto à base de leite de vaca, ou de outros animais e/ou outros constituintes de animais, incluindo peixe, ou de origem vegetal, que tenham provado ser seguros para a alimentação infantil (TURK, 2008). Evidentemente, deve-se considerar que, por mais evoluída que seja a tecnologia para a elaboração desses produtos, é preciso reconhecer que haverá sempre limitações relativamente ao que se pretende atingir com a modificação do leite de outras espécies, porque algumas funções são específicas da espécie.

De tal forma, é possível identificar que o desenvolvimento de fórmulas infantis passou por quatro conceitos importantes: a) o primeiro reporta-se à exclusividade do leite de cada espécie, por ser única e ter como objetivo proporcionar o adequado crescimento e desenvolvimento da sua espécie; b) o segundo refere-se às particularidades das fórmulas infantis baseadas numa composição que se aproxime ao máximo da composição do leite humano; c) o terceiro conceito relaciona-se com a relação qualidade/eficácia/segurança, visto que, embora a semelhança da composição e a adequação da fórmula sejam avaliadas pela sua eficácia e segurança na promoção de um perfil de “crescimento fisiológico”, os valores relativos aos parâmetros bioquímicos e funcionais não são superiores aos dos lactentes

alimentados com leite humano; d) o quarto conceito reporta-se às regras gerais de inclusão de nutrientes nas fórmulas infantis, tendo como referência o reconhecido impacto da composição da dieta do lactente não apenas no crescimento, desenvolvimento e maturação, mas também no binômio saúde/doença ao longo da vida (KOLETZKO et al, 2005; RÊGO et al, 2013).

Por isso, nos anos de 1970, foram determinados os limites mínimos de proteínas, gorduras, ácido linoleico e de 17 vitaminas e minerais às fórmulas comerciais. A partir de então, houve uma crescente utilização de fórmulas desidratadas, e, ao mesmo tempo, um estímulo ao aleitamento materno. Isso porque as fórmulas eram geralmente usadas ou em refeições ocasionais para lactentes que eram amamentados ou para que pudessem também ser usadas após o desmame. Naquela mesma época, a explosão de conhecimentos sobre a composição do leite materno e seus benefícios acelerou o processo de aperfeiçoamento das fórmulas (FOMON, 2001). Nas décadas de 1970 a 1990 a adição de ferro às fórmulas infantis constituiu-se em um avanço significativo, especialmente nos Estados Unidos, contribuindo para a prevenção de anemia ferropriva nesse país (SHERRY *et al.*, 2001; SCHNEIDER *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas, os fabricantes de fórmulas infantis começaram a examinar os benefícios da adição de uma variedade de nutrientes, como os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, especialmente à relação entre os ácidos graxos n-6 (C18:2 – linoleico) e n-3 (C18:3 – linolênico), às fórmulas infantis para que estas se aproximassem cada vez mais da composição e da qualidade do leite humano (INFANT NUTRITION AND FEEDING, 2009; CARVER, 2003; STRAARUP *et al.*, 2006). Isto porque os ácidos graxos essenciais (AGE) compõem uma classe de moléculas que não podem ser sintetizadas pelo organismo, devido à carência de enzimas dessaturases e hidrogenases (KOLETZKO et al, 2003; SILVA et al, 2007, b).

Dessa forma, a indústria procura desenvolver fórmulas infantis com uma composição química próxima à composição do leite humano, e, com relação à fração lipídica, ela recorre à adição de uma mistura de óleos vegetais (milho, soja, oliva, girassol). Apesar do avanço no processo tecnológico, essas fórmulas ainda apresentam grandes diferenças na composição quando comparadas ao leite

humano (CARVER, 2003). Os principais ácidos graxos presentes nos óleos vegetais são os ácidos oleico (AO), linoleico (AL) e linolênico (ALA), mas a presença desses nutrientes nas fórmulas infantis não assegura a ingestão adequada do ácido α -linolênico e dos derivados dos ácidos graxos de cadeia longa (EPA, DHA e ARA). Além disto, esses óleos também não são fontes de colesterol.

As fórmulas infantis, líquidas ou em pó, são, geralmente, produtos à base de leite de vaca ou de outros animais, ou de uma mistura destes e/ou de outros ingredientes comprovadamente adequados para alimentação de lactentes e crianças de primeira infância. Assim, estão agrupadas como: Fórmula infantil para lactentes e de seguimento para lactentes; Fórmula infantil para lactentes à base de leite de vaca – se o leite de vaca for a única fonte de proteínas e Fórmula infantil para lactentes à base de soja – se a soja for a única fonte de proteína. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fundamentada nas normas do *Codex Alimentarius*, regulamenta as fórmulas infantis para lactentes. O Quadro 1 descreve os principais parâmetros que definem a composição de tais produtos, especialmente com relação à fração lipídica, objeto deste estudo.

Quadro 1: Definição e parâmetros para a fração lipídica de fórmulas infantis, segundo a legislação vigente no Brasil (RDC n.º 43/2011, RDC n.º 44/2011, RDC n.º 45/2011)

Produto	Teor de lipídios
<p>Fórmula infantil para lactentes – RDC 43/2011 – Produto em forma líquida ou em pó, utilizado sob prescrição, especialmente fabricado para satisfazer, por si só, as necessidades nutricionais dos lactentes saudáveis durante os primeiros seis meses de vida (5 meses e 29 dias)</p>	<p>Gorduras totais = 4,4 g/100 kcal (1,05 g/100 kJ) e o máximo de 6,0 g/100 kcal (1,4 g/100 kJ). Gorduras hidrogenadas e óleos hidrogenados não podem ser utilizados. Ácidos láurico e mirístico não podem ultrapassar, conjuntamente, 20% do conteúdo total de ácidos graxos. Conteúdo de ácidos graxos <i>trans</i> no produto não pode ultrapassar 3% do conteúdo total de ácidos graxos. Conteúdo de ácido erúxico não pode ultrapassar 1% do conteúdo total de ácidos graxos. Conteúdo total de fosfolipídios não pode ultrapassar 300 mg/100 kcal (72 mg/100 kJ). Conteúdo mínimo de ácido linoleico deve ser de 300 mg/100 kcal (70 mg/100 kJ) e o seu limite superior de referência deve ser de 1400 mg/100 kcal (330 mg/100 kJ). Conteúdo mínimo de ácido α-linolênico deve ser de 50 mg/100 kcal (12 mg/100 kJ), sem limite máximo especificado. Razão mínima de ácido linoleico/ácido α-linolênico deve ser de 5:1 e a máxima de 15:1. Conteúdo de ácido araquidônico (20:4 n-6) deve atingir pelo menos a mesma concentração do ácido docosahexaenoico. Conteúdo de ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3), que pode ocorrer em fontes de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA), não pode exceder o conteúdo de ácido docosahexaenoico.</p>
<p>Fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância – RDC 44/2011 – Produto em forma líquida ou em pó, utilizado quando indicado, para lactentes saudáveis a partir do sexto mês de vida até doze meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias) e para crianças de primeira infância saudáveis (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.</p>	<p>Gorduras totais deve ser de 4,0 g/100 kcal (0,96 g/100 kJ) e o máximo de 6,0 g/100 kcal (1,4 g/100 kJ). Gorduras hidrogenadas e óleos hidrogenados não podem ser utilizados. Ácidos láurico e mirístico não podem ultrapassar, conjuntamente, 20% do conteúdo total de ácidos graxos. Conteúdo de ácidos graxos <i>trans</i> no produto não pode ultrapassar 3% do conteúdo total de ácidos graxos. Conteúdo de ácido erúxico não pode ultrapassar 1% do conteúdo total de ácidos graxos. Conteúdo total de fosfolipídios não pode ultrapassar 300 mg/100 kcal (72 mg/100 kJ). Conteúdo mínimo de ácido linoleico deve ser de 300 mg/100 kcal (70 mg/100 kJ) e o seu limite superior de referência deve ser de 1400 mg/100 kcal (330 mg/100 kJ). Conteúdo mínimo de ácido α-linolênico deve ser de 50 mg/100 kcal (12 mg/100 kJ), sem limite máximo especificado. Razão mínima de ácido linoleico/ácido α-linolênico deve ser de 5:1 e a máxima de 15:1.</p>

Quadro 1: Definição e parâmetros para a fração lipídica de fórmulas infantis, segundo a legislação vigente no Brasil (RDC n.º 43/2011, RDC n.º 44/2011, RDC n.º 45/2011) (Continuação)

<p>Fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas – RDC 45/2011 – Aquela cuja composição foi alterada ou especialmente formulada para atender, por si só, as necessidades específicas decorrentes de alterações fisiológicas e/ou doenças temporárias ou permanentes e/ou para a redução de risco de alergias em indivíduos predispostos de lactentes até o sexto mês de vida (5 meses e 29 dias).</p> <p>Fórmula infantil de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinada a necessidades dietoterápicas específicas; aquela cuja composição foi alterada ou especialmente formulada para atender as necessidades específicas decorrentes de alterações fisiológicas e/ou doenças temporárias ou permanentes e/ou para a redução de risco de alergias em indivíduos predispostos de lactentes a partir do sexto mês de vida até doze meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias) e de crianças de primeira infância, constituindo-se o principal elemento líquido de uma dieta progressivamente diversificada.</p>	<p>O conteúdo energético e a composição de nutrientes devem ser modificados para atingir as necessidades nutricionais especiais decorrentes de alterações fisiológicas e/ou doenças temporárias ou permanentes e/ou para redução de risco de alergias em indivíduos predispostos, para os quais o produto é especificamente formulado.</p> <p>Além destes requisitos, os seguintes teores para os nutrientes devem ser considerados, quando apropriado para a eficácia da finalidade a que se propõem as fórmulas infantis para necessidades dietoterápicas específicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Quando forem adicionados os nutrientes ácido docosahexaenoico (DHA), ácido araquidônico (ARA), entre outros, suas quantidades devem ser declaradas na informação nutricional.
--	--

Considerando que a formulação das fórmulas infantis para lactentes visa mimetizar a composição química do leite humano maduro, é de se esperar que haja mudanças tanto em relação ao perfil lipídico quanto em relação à estrutura dos glóbulos de gordura que podem afetar a digestão destes nutrientes. Gallier et al. (2015) identificaram que, de maneira geral, o diâmetro dos glóbulos de gordura em fórmulas infantis padrão é de $0,4\mu\text{m}$, com base no volume, e que as proteínas são os principais emulsificantes destes glóbulos de gordura.

Tais características levam à obtenção de um produto estável, com uma longa vida de prateleira, mas com uma estrutura de MGGL fortemente diferente daquela do leite humano. Estudos mostraram que o tipo de emulsionante, bem como o tamanho dos glóbulos de gordura, afeta a lipólise. Em lactentes prematuros, a hidrólise dos triglicerídios do leite humano foi mais elevada do que a de triglicerídios de uma fórmula infantil com pequenas gotículas de gordura revestidas por proteínas. Este efeito foi atribuído à diferença em tamanho e à diferença interfacial do revestimento das gotículas de gordura em adição aos distintos perfis de ácidos graxos existentes entre o leite humano e a fórmula infantil para lactentes (GALLIER, et al. 2015).

Dado o emergente interesse na bioatividade dos compostos MGGL e o potencial efeito desta estrutura na digestão, absorção de lipídios e destino metabólico, faz-se relevante o desenvolvimento de produtos que imitem mais apropriadamente a composição e estrutura dos glóbulos de gordura do leite humano.

3. HIPÓTESE

A fração lipídica e a composição em ácidos graxos são indicadores importantes na composição de fórmulas infantis para lactentes pela relevância desses nutrientes em termos nutricionais e fisiológicos, assim como o diâmetro dos glóbulos de gordura. De maneira geral, a fração lipídica em tais fórmulas é obtida por meio de uma base de leite de vaca ou de outros animais, ou de uma mistura destes e/ou de outros ingredientes comprovadamente adequados, de tal modo que a seleção e a quantidade de cada fonte lipídica determinará o perfil de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados nas fórmulas infantis.

Assim, a indústria procura desenvolver fórmulas infantis com uma composição química próxima à composição do leite humano, e, com relação à fração lipídica, ela recorre à adição de uma mistura de óleos vegetais (milho, soja, oliva, girassol). Apesar do avanço no processo tecnológico, essas fórmulas ainda apresentam grandes diferenças na composição e na estrutura da membrana do glóbulo de gordura, quando comparadas ao leite humano (CARVER, 2003).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Determinar o perfil lipídico e as características físicas dos glóbulos de gordura de fórmulas infantis para lactentes.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar o teor de lipídios totais no padrão de amostras de leite humano;
- Determinar o teor de lipídios totais em dez tipos diferentes de fórmulas infantis para lactentes;
- Determinar o perfil de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados no padrão de amostras de leite humano;
- Determinar o perfil de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados em dez tipos diferentes de fórmulas infantis para lactentes;

Determinar os teores de ácido linoleico e linolênico em dez tipos de fórmulas infantis para lactentes.

- Determinar o diâmetro dos glóbulos de gordura em um *pool* de amostras de leite humano;
- Determinar o diâmetro dos glóbulos de gordura em dez tipos de fórmulas infantis para lactentes.

5. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa se caracterizou como de natureza exploratória e com abordagem quantitativa. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas da Faculdade de Medicina – UnB, conforme Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 44750415.6.0000.5558. (Anexo B)

5.1 Amostras

As amostras foram coletadas de 03 diferentes lotes de 10 fórmulas infantis para lactentes, em pó, utilizadas como substituto ao leite materno no Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB), totalizando 30 amostras, no período de abril/2014 a outubro/2015 (Tabela 4).

A amostra de leite humano foi constituída de 10 doadoras de leite maduro proveniente do banco de leite do Hospital Universitário de Brasília (HUB), coletado de julho a setembro de 2015, que foi utilizado como padrão. As doadoras tinham idade em média de 26 anos, massa corporal média de 72kg, altura variando de 1,50m a 1,68m e o período de lactação entre 30 a 60 dias após o parto, no momento da coleta. O período gestacional de nove mães correspondeu à faixa entre 38 e 41 semanas. Somente uma das mães apresentou período gestacional de prematuridade, de 34 semanas.

Todas as amostras coletadas foram acondicionadas hermeticamente e imediatamente transportadas ao Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB, onde foram preparadas e, posteriormente, utilizadas para a realização das análises.

Tabela 4: Informações declaradas na rotulagem das fórmulas infantis para lactentes analisadas

Classificação	Produto	Fonte Lipídica	g/100mL	g/100kcal
Fórmula infantil para lactentes	FIR	Perfil de lipídios: 80% de gordura vegetal (óleos de canola, girassol, palma e coco) e 20% de gordura láctea.	Lipídeos - 3,50 C18:2 – 0,60 C18:3 – 0,05 ω 3: ω 6 – 10,25	Lipídeos - 5,20 C18:2 – 0,90 C18:3 – 0,08 ω 3: ω 6 – 10,25
	FIP	Perfil de lipídios: 97% de gordura de origem vegetal (oleína de palma, óleo de palmiste, óleo de canola, óleo de milho, óleo de peixe (fonte de DHA), lecitina de soja, óleo de <i>Mortierella alpina</i> (fonte de ARA) e 3% de gordura láctea e óleo de peixe, lecitina de soja, ácido graxo araquidônico.	Lipídeos - 3,60 C18:2 – 0,50 C18:3 – 0,067 ω 3: ω 6 – 7,9	Lipídeos – 5,4 C18:2 – 0,80 C18:3 – 0,100 ω 3: ω 6 – 7,9
	FIPRNBP	Perfil de lipídios: 94% de gordura vegetal (óleos de palma, coco, colza, girassol, prímula e óleos estruturados) (tiglicerídios de cadeia média e óleo de <i>Mortierella alpina</i>) e 6% de gordura animal (fosfolipídios de gema de ovo, óleo de peixe, e gordura láctea; adição de ARA na concentração de 0,46% e de DHA na concentração de 0,35% dos lipídios totais.	Lipídeos - 4,40 Ácido araquidônico – 0,019 Ácido docosahexaenoico – 0,015 C18:2 – 0,56 C18:3 – 0,08 ω 3: ω 6 – 5,80	Lipídeos – 5,50 Ácido araquidônico – 0,024 Ácido docosahexaenoico – 0,018 C18:2 - 0,70 C18:3 - 0,10 ω 3: ω 6 - 5,80
	FIEAPG	Perfil de lipídios: 97% de gordura de origem vegetal (oleína de palma, óleo de canola, óleo de palmiste, óleo de milho, lecitina de soja) e 3% de gordura láctea; fornece os teores recomendados dos ácidos linoleico e α -linolênico.	Lipídeos - 3,10 C18:2 – 0,50 C18:3 – 0,061 ω 3: ω 6 – 8,00	Lipídeos -4,70 C18:2 – 0,70 C18:3 – 0,092 ω 3: ω 6 – 8,00

FIR – Fórmula Infantil de Rotina; FIP – Fórmula Infantil de Partida; FIPRNBP – Fórmula Infantil para Prematuros e Recém-Nascidos de Baixo Peso; FIEAPG – Fórmula Infantil Espessada com Amido Pré-Gelatinizado; FIS – Fórmula Infantil de Segmento; FIASPLVM – Fórmula Infantil Elementar para Alergia Severa a Proteína do Leite de Vaca e a Múltiplos Alimentos; FIIL – Fórmula Infantil Isenta de Lactose; FIPIS – Fórmula Infantil à Base de Proteína Isolada de Soja; FIPEH – Fórmula Infantil à Base de Proteína Extensamente Hidrolisada do Soro do Leite; FIPSLPH – Fórmula Infantil à Base de Proteína de Soro de Leite Parcialmente Hidrolisada.

Tabela 4: Informações declaradas na rotulagem das fórmulas infantis para lactentes analisadas (Continuação)

Classificação	Produto	Fonte Lipídica	g/100mL	g/100kcal
Fórmulas infantis de seguimento para lactentes	FIS	Perfil de lipídios: 98% de gorduras de origem vegetal (oleína de palma, óleo de palmiste, óleo de canola, óleo de milho, lecitina de soja); 2% gordura láctea; fornece os teores recomendados dos ácidos linoleico e α linolênico.	Lipídeos - 3,10 C18:2 – 0,50 C18:3 – 0,06 ω 3: ω 6 – 7,7	Lipídeos – 4,60 C18:2 – 0,70 C18:3 – 0,09 ω 3: ω 6
	FIASPLVM	Perfil lipídico: LCPUFAS (DHA e ARA, 1:1); triglicerídios de cadeia média.	Lipídeos – 3,45 AG saturados – 1,10 AG monoinsaturados – 1,70 AG poli-insaturados – 0,70 C18:2 – 0,600 C18:3 – 0,060 ω 3: ω 6 – 10	Lipídeos – 3,83 AG saturados* AG monoinsaturados* AG poli-insaturados* C18:2* C18:3* ω 3: ω 6 - 10
Fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas	FIIL	Perfil de lipídios: 98% gordura de origem vegetal (oleína de palma, óleo de canola, óleo de coco, óleo de girassol, lecitina de soja, ácido docosahexaenoico, ácido araquidônico); 2% gordura láctea. Adição de lecitina de soja, ácido docosahexaenoico, ácido araquidônico.	Lipídeos – 3,30 C18:2 – 0,50 C18:3 – 0,067 ω 3: ω 6 – 8,00	Lipídeos – 5,00 C18:2 – 0,80 C18:3 – 0,099 ω 3: ω 6 – 8,00
	FIPIS	Perfil de lipídios: 100% de gorduras de origem vegetal (oleína de palma, óleo de soja, óleo de coco, óleo de girassol); fornece os teores recomendados dos ácidos linoleico e α linolênico.	Lipídeos – 3,40 C18:2 – 0,60 C18:3 – 0,066 ω 3: ω 6 – 9,2	Lipídeos – 5,40 C18:2 – 0,90 C18:3 – 0,098 ω 3: ω 6 – 9,2
	FIPEH	Perfil de lipídios: 50% triglicerídios de cadeia média; 49% óleos vegetais (<i>colza</i> , girassol, palma); 1% óleo de peixe e óleo de <i>Mortierella alpina</i> ; adição de ARA (0,2%) e de DHA (0,2%) dos lipídios totais.	Lipídeos – 3,50 Ácido araquidônico – 0,0067 Ácido docosahexaenoico – 0,0067 C18:2 – 0,48 C18:3 – 0,09 ω 3: ω 6 – 5,4	Lipídeos – 5,30 Ácido araquidônico – 0,0100 Ácido docosahexaenoico – 0,0100 C18:2 – 0,72 C18:3 – 0,13 ω 3: ω 6 – 5,4
	FIPSLPH	Perfil de lipídios: 97% de gorduras de origem vegetal (oleína de palma, óleo de coco, óleo de girassol, óleo de peixe – fonte de DHA, óleo vegetal proveniente da <i>Mortierella alpina</i> – fonte de ARA); 3% gordura láctea; fornece os teores recomendados dos ácidos linoleico e α -linolênico. Adição de ácido graxo araquidônico.	Lipídeos – 3,40 C18:2 – 0,50 C18:3 – 0,052 ω 3: ω 6 – 9,50	Lipídeos – 5,10 C18:2 – 0,70 C18:3 – 0,078 ω 3: ω 6 – 9,50

FIR – Fórmula Infantil de Rotina; FIP – Fórmula Infantil de Partida; FIPRNPB – Fórmula Infantil para Prematuros e Recém-Nascidos de Baixo Peso; FIEAPG – Fórmula Infantil Espessada com Amido Pré-Gelatinizado; FIS – Fórmula Infantil de Segmento; FIASPLVM – Fórmula Infantil Elementar para Alergia Severa a Proteína do Leite de Vaca e a Múltiplos Alimentos; FIIL – Fórmula Infantil Isenta de Lactose; FIPIS – Fórmula Infantil à Base de Proteína Isolada de Soja; FIPEH – Fórmula Infantil à Base de Proteína Extensamente Hidrolisada do Soro do Leite; FIPSLPH – Fórmula Infantil à Base de Proteína de Soro de Leite Parcialmente Hidrolisada.

5.2. Análises químicas

5.2.1 Quantificação de Lipídios Totais

A quantificação de lipídios totais nas amostras das fórmulas infantis comerciais e nas de leite humano foi realizada em triplicata pelo método butirométrico de Gerber – Van Gulik (BRASIL, 2005).

O método consiste em separar a gordura do leite existente na forma de glóbulos emulsionados por membrana composta por fosfolipídios, proteínas e água de hidratação, que evitam sua coalescência. Para a determinação completa do teor de gordura, essa camada deve ser destruída, o que se consegue pela ação do ácido sulfúrico que oxida e hidrolisa seus componentes orgânicos. A gordura liberada é separada por centrifugação, facilitada pela adição de álcool isoamílico que evita a carbonização dos açúcares pelo calor e ácido sulfúrico, dificultando a leitura do teor de gordura. O resultado é uma linha divisória entre a gordura e a solução ácida, cujo teor é lido na haste do butirômetro diretamente em porcentagem (ALAN; WOLFSCHOON, 1980).

Materiais usados:

Centrífuga marca ITR, modelo SBT, n.º177;

Pipetas graduadas de 5mL, 10mL;

Pipeta volumétrica de 11mL;

Butirômetro de Gerber;

Rolhas de silicone para butirômetro.

Reagentes:

Álcool isoamílico PA – Vetec;

Ácido sulfúrico PA – Vetec.

Procedimentos:

A amostra do padrão de leite humano foi analisada na sua forma original; quanto às fórmulas infantis para lactentes, foram inicialmente reconstituídas

conforme orientação de cada fabricante constante no rótulo (em torno de 4,4g de pó para 30mL de água filtrada).

Em butirômetros de Gerber, foram adicionados 10mL de ácido sulfúrico PA (D=1,82 g/mL), 11mL de leite e 1mL de álcool isoamílico PA. Após tampados com rolha de silicone e agitação até completa dissolução do coágulo formado, os butirômetros foram centrifugados a 1.100rpm, durante 5 minutos e lidos os teores de gordura.

5.2.2 Extração de lipídios totais pelo método Bligh Dyer

Para as fórmulas infantis para lactentes, a extração de lipídios totais foi realizada pelo método (Bligh & Dyer, 1959), em triplicata, com a finalidade de posterior esterificação (metilação) dos ácidos graxos para a análise cromatográfica.

O método de Bligh Dyer é aplicável a qualquer tipo de alimento, porém a amostra deve apresentar no máximo 10% de umidade. Esse método é bastante simples e se caracteriza pela distinção de fases de um sistema formado basicamente pela amostra, metanol, clorofórmio e água colocados em devidas proporções. Apresenta vantagens marcantes sobre a maioria dos métodos existentes de extração e purificação de lipídeos, a saber:

Todas as camadas de lipídios são extraídas (polares e apolares), pois o clorofórmio é um solvente orgânico para qualquer classe de lipídeos, e o metanol tem a função dupla de facilitar a absorção/embebimento e desfazer/hidrolisar as ligações lipoproteicas;

A extração é realizada sem aquecimento, permitindo a utilização dos lipídeos extraídos para qualquer tipo de determinação, sem alterações químicas e físicas.

Materiais usados:

Tubos de ensaio 250 × 25mm (capacidade de 70mL) com tampa de rosca;

Tubos de ensaio 150 × 15mm (capacidade de 30mL) com tampa de rosca;

Béquer de 50mL;

Pipeta volumétrica de 10mL;

Pipeta volumétrica de 5mL;

Pipeta graduada de 10mL;

Tubo de ensaio comum;
Agitador para tubos;
Centrífuga de baixa rotação.

Reagentes:

Clorofórmio P.A;
Metanol P.A;
Sulfato de sódio anidro P.A;
Solução de sulfato de sódio a 1,5%.

Procedimentos:

Foram pesados 2,5g de amostra em pó, que foram transferidas para o tubo de 70mL. Foram adicionados exatamente 10mL de clorofórmio, 20mL de metanol e 8mL de água destilada. Agitou-se a mistura no agitador rotativo por 30min. Adicionaram-se exatamente mais 10mL de clorofórmio e 10mL de solução de sulfato de sódio a 1,5%. Agitou-se vigorosamente por 2min e centrifugou-se a 1000rpm, por dois minutos. Em seguida a camada metanólica superior foi aspirada e descartada. Retirou-se a camada inferior (clorofórmio) e colocou-se em um tubo de 30mL e se adicionou aproximadamente 1g Na₂SO₄, tampou-se e agitou-se (a fim de remover traços de água arrastados). Filtrou-se rapidamente num funil pequeno em papel de filtro qualitativo, recebendo o filtrado em um béquer de 50mL, que foi levado posteriormente para a estufa a 40 °C para a evaporação do clorofórmio, permanecendo no béquer apenas o lipídio extraído a frio.

5.2.3 Esterificação (metilação) dos ácidos graxos

A metilação, feita segundo Christie (1989), tem a função de transformar os ácidos graxos livres em metil ésteres, o que facilita sua volatilização na coluna do cromatógrafo.

Materiais usados:

Balança analítica eletrônica AEL-200 CG Libror, Marca Instrumentos Científicos CG Ltda, capacidade 200g (Precisão 0,1mg);
Banho-maria marca Tecnal, modelo TE-057;
Agitador mecânico vortex;

Tubos de ensaio com tampa rosqueável;
Centrífuga marca ITR, modelo SBT, n.º177;
Pipetas graduadas de 1mL, 2mL, 5mL, 10mL;
Pipetas de Pasteur;
Tubo de vidro com capacidade volumétrica de 2mL, com tampa rosqueável.

Reagentes:

Hidróxido de potássio (KOH) PA – Vetec;
Trifluoreto de boro (BF₃), 14% em metanol (Sigma);
Cloreto de sódio (NaCl) PA – (Vetec);
Hexano (Grau cromatográfico – Sigma);
Metanol PA – (Vetec);
Gás nitrogênio (White Martins, Brasil).

Procedimentos:

Alíquotas de 20mg de lipídios totais das amostras, extraídas pelos métodos Bligh & Dyer quanto pelo butirômetro de Gerber, foram pesadas, e transferidas, em triplicatas, para tubos de ensaio com tampas rosqueáveis, e em seguida foram submetidas a esterificação dos ácidos graxos. Esse processo transforma os ácidos graxos livres em metil ésteres, facilitando a sua volatilização na coluna do cromatógrafo. Em seguida, foram adicionados 1,5mL de uma solução de hidróxido de potássio 0,5M em metanol para a saponificação dos ácidos graxos; a amostra foi agitada em agitador vortex por 1 minuto e, em seguida, a mistura resultante foi colocada em banho-maria a 70 °C por 5 minutos e resfriada imediatamente em água corrente.

Após o resfriamento, foram adicionados 2mL de solução de trifluoreto de boro (BF₃, PA), 14% em metanol, seguido de nova agitação mecânica em vortex por 1 minuto, aquecimento em banho-maria a 70 °C por 5 minutos e resfriamento imediato em água corrente. O BF₃ catalisa a metilação ao transferir o grupo metil do metanol para o ácido graxo formando um éster metílico de ácido graxo.

Na sequência, à mistura resultante foram adicionados 2,5mL de solução de cloreto de sódio saturado e 1mL de hexano (grau cromatográfico), seguida de

centrifugação por 10 minutos a 1200rpm. A solução de cloreto de sódio saturada facilita a separação dos lipídios devido à diferença de densidade das fases líquidas; já o hexano extrai os ácidos graxos da fase metanólica, formando o sobrenadante.

O sobrenadante foi recolhido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferido para outro tubo de vidro com capacidade volumétrica de 2mL, com tampa rosqueável, septo de silicone e atmosfera saturada de nitrogênio. As amostras foram armazenadas a -18 °C até o momento das análises no cromatógrafo a gás.

5.2.4 Análise cromatográfica dos ácidos graxos esterificados

Técnicas de separação, como cromatografia gasosa (CG), se destacam na química analítica pela capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em diversas amostras. Consiste em um processo físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizado através da distribuição desses componentes entre duas fases – a fase estacionária e a fase móvel – que estão em contato íntimo (CHRISTIE, 1989). Os triglicerídeos são os compostos de maior ponto de ebulição que podem ser analisados por CG. O desenvolvimento das colunas capilares aperfeiçoou sua aplicabilidade para caracterização de óleos e gorduras, com uma resolução suficiente para diferenciar os triglicerídeos insaturados. A grande versatilidade dessa técnica fundamenta-se no grande poder de resolução e extrema inércia química das colunas capilares, além da facilidade de utilização de vários sistemas de detecção e de contar com sistemas não discriminatórios de transferência de amostra (PEREIRA; AQUINO NETO, 2000).

O termo “cromatografia” foi utilizado, pela primeira vez, em 1906 pelo botânico russo Mikhail Semenovich Tswett, que desenvolveu uma técnica de adsorção para separar pigmentos de folhas, em 1903. Nos anos seguintes ele aperfeiçoou a técnica que passou a ser chamada de cromatografia (*chrom* = cor e *graphie* = escrita) (SCOTT, 2003). A cromatografia foi praticamente ignorada até a década de 1930, quando foi redescoberta. A partir daí, diversos trabalhos na área possibilitaram seu aperfeiçoamento e, em conjunto com os avanços tecnológicos, levaram-na a um elevado grau de sofisticação que resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas. Assim, surgiram várias técnicas cromatográficas baseadas na classificação da fase móvel (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Material usado:

Cromatógrafo gasoso CG-2010 Shimadzu com detector MS-QP2010 Plus, (quadrupolo, impacto de elétrons) com autoinjeter AOC-5000.

Coluna cromatográfica J & W Scientific 122-2362 DB-23, 60m (comprimento), 0.25mm ID (diâmetro interno), 0.25 μ m (espessura do filme).

Reagentes:

Padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos Supelco 37 component FAME mix (Supelco[®], USA);

Procedimento:

Todas as amostras de fórmulas infantis e leite humano, foram analisadas em triplicata na Central Analítica do Instituto de Química – IQ/UnB. A análise dos ácidos graxos esterificados (metilados) foi realizada no cromatógrafo gasoso CG-2010 Shimadzu com detector MS-QP2010 Plus, (quadrupolo, impacto de elétrons) com autoinjeter AOC-5000. A separação dos ácidos graxos foi feita utilizando a Coluna J & W Scientific 122-2362 DB-23, 60 m (comprimento), 0.25 mm ID (diâmetro interno), 0.25 μ m (espessura do filme). (Figura 03). Como gás de arraste foi utilizado o Hélio, com fluxo contínuo na coluna de 0,40 ml/minuto. O volume injetado foi de 1 μ L. A temperatura de interface do detector MS-QP2010 Plus foi de 260°C.

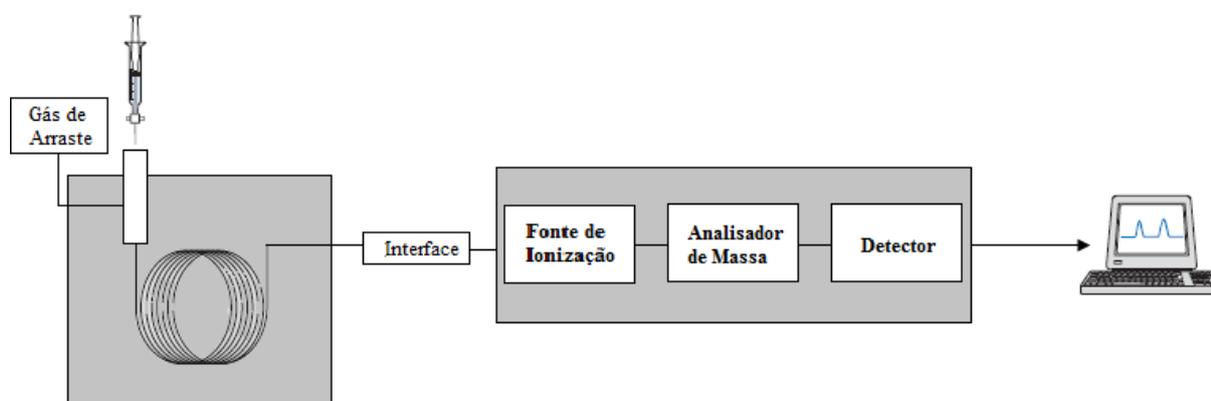


Figura 3: Esquema básico de um cromatógrafo Gasoso – MS

Fonte: FERREIRA, 2011

O detector do cromatógrafo gasoso utilizado consiste em um espectrômetro de massas (Shimadzu, GCMS-QP2010 Plus) acoplado diretamente à saída da coluna capilar. Nesse detector, as moléculas que saem da coluna são fragmentadas e ionizadas por um ionizador de impacto de elétrons, e os íons produzidos têm sua razão entre massa e carga (m/z) medidas em um analisador do tipo quadrupolo. O quadrupolo funciona como um filtro de massas e possibilita que uma varredura na faixa de 40 até 600 m/z seja realizada. Os íons que saem do quadrupolo são detectados e seu sinal amplificado, gerando, assim, um espectro de massas para cada substância separada na cromatografia (SILVERSTEIN & WEBSTER, 1998). (Figura 04).

As condições cromatográficas estabelecidas foram: O modo de injeção *Split*, com temperatura do injetor igual a 260°C; a rampa de aquecimento da coluna com início em 140°C, permanecendo a essa temperatura por 5 minutos, em seguida aumentada em 2°C, a cada minuto, até atingir 240°C, totalizando 56 minutos da corrida cromatográfica.

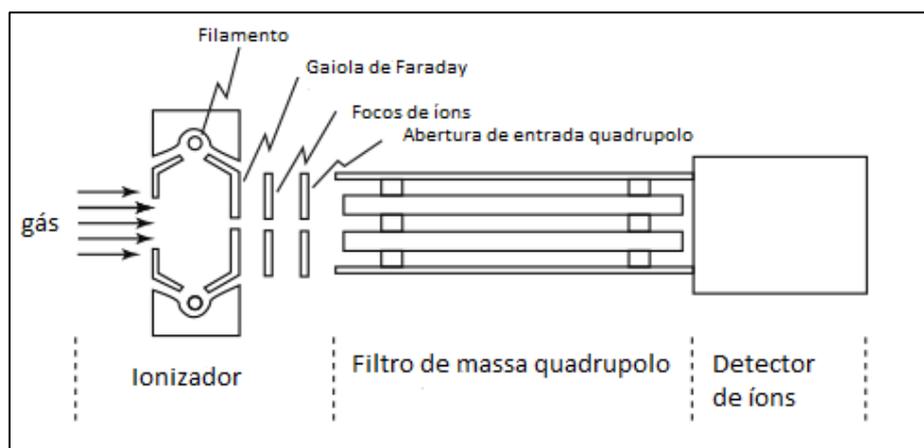


Figura 4: Esquema do detector massas quadrupolo com impacto de elétrons

A identificação de cada ácido graxo foi feita por comparação com o tempo de retenção do padrão de ácidos graxos Supelco 37 component FAME mix (Supelco®, USA) e confirmados com os espectros de tais substâncias, já existentes em uma biblioteca no programa do próprio equipamento.

Os resultados foram expressos em percentual da área de cada ácido graxo, em relação à área dos ácidos graxos totais.

5.2.5 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um tipo de aparelho, com alto poder de resolução, da ordem de 2 nm a 5nm para instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução menor que 1 nm, fornecendo informações sobre a morfologia e identificação, ou seja, características microestruturais de elementos químicos de uma amostra sólida, além da aparência tridimensional da imagem das amostras, resultante da grande profundidade de campo (NAGATANI et al. 1987; DEDAVID, et al, 2007).

O princípio de funcionamento do MEV consiste no uso de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro que explora a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas, transmitindo o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe varre a superfície da amostra, segundo uma malha retangular. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. O sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo sua observação.

A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) aquecido, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV. O feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo. Ele é, em seguida, focalizado sobre a amostra por uma série de três lentes eletromagnéticas com um *spot* menor que 4 nm. Quando o feixe interage com a amostra, produz elétrons e fótons que podem ser coletadas por detectores adequados e convertidos em um sinal de vídeo. Quando o feixe primário incide na amostra, parte dos elétrons difunde-se e constitui um volume de interação cuja forma depende principalmente da tensão de aceleração e do número atômico da amostra. Nesse volume, os elétrons e as ondas eletromagnéticas produzidos são utilizados para formar as imagens.

Para serem detectadas, as partículas e/ou os raios eletromagnéticos resultantes da interação do feixe eletrônico com a amostra devem retornar à superfície da amostra para atingirem o detector. A profundidade máxima de detecção, portanto, a resolução espacial, depende da energia com que estas

partículas ou raios atingem o detector, ou são capturadas pelo mesmo. A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que esta resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Diferentes sinais podem ser emitidos pela amostra e, entre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários e/ou dos elétrons retroespalhados.

Assim, o funcionamento do MEV se inicia em uma coluna específica, em alto vácuo, que gera um feixe de elétrons de alta intensidade, a partir de um filamento de tungstênio, por efeito termiônico; o feixe de elétrons é acelerado por uma diferença de potencial entre cátodo e ânodo entre 0,3kV a 30kV. O feixe gerado passa por lentes condensadoras que reduzem o seu diâmetro e por uma lente objetiva que o focaliza sobre a amostra. Acima da lente objetiva encontram-se dois estágios de bobinas eletromagnéticas responsáveis pela varredura do feixe de elétrons sobre a amostra. O feixe interage com a região de incidência da amostra até uma profundidade que pode variar de $1\mu\text{m}$ a $6\mu\text{m}$, dependendo da natureza da amostra. Esta região é conhecida por volume de interação, que gera os sinais que são detectados, modulados e utilizados para a formação da imagem micrografada, que é transmitida para a tela do computador (DEDAVID, et al, 2007). (Figura 5)

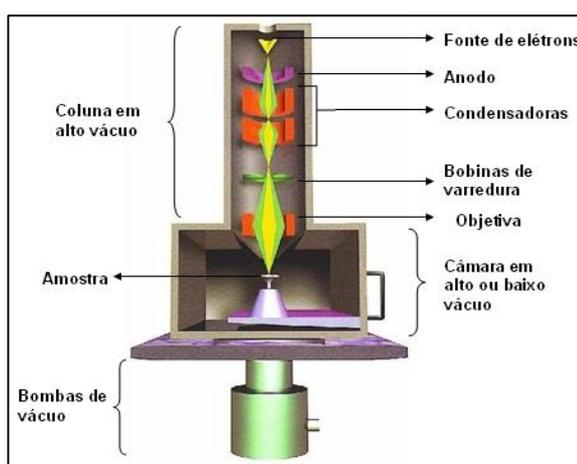


Figura 5: Esquema básico do funcionamento do MEV

Fonte: <http://fap.if.usp.br/~lff/mev.html>

Material usado:

Tubo (capacidade de 70 ml)

Centrífuga para 04 tubos (Quimis – Modelo: Q222T284)

Tubos eppendorf

Lamínulas de vidro (24 x 24mm)

Suporte (Stub)

Fita carbono

Metalizador (Sputer Coater, SCD-050, Balzers)

Microscópio Eletrônico de Varredura (Field Emission Scanning Electron Microscope, JSM-7001F, Jeol).

Reagentes:

Solução Karnovisk (0,1 M)

Solução tampão Cacodilato de Sódio (0,1M)

Tetróxido de Ósmio (1%)

Ferrocianeto de Potássio (0,5%)

Álcool etílico (30%, 50%, 70%, 90% e 100%)

Procedimentos:

Os 03 lotes de cada uma das amostras de fórmulas infantis para lactentes analisadas, foram inicialmente reconstituídas separadas, conforme orientação de cada fabricante (4,4g de pó para 30mL de água). Em seguida, os lotes foram agregados e transformados em um pool de cada amostra. Assim foram retirados 50 ml de cada pool de amostra de fórmula infantil, bem como o *pool* das amostras de leite humano. Foram acondicionados separadamente em tubos falco com tampa rosqueável, com capacidade de 70mL, centrifugados a 6000rpm, na Centrífuga para 04 tubos (Quimis – Modelo: Q222T284), durante 10 minutos; a camada superior de lactato, contendo lipídios, de cada amostra, foi retirada para ser analisada. Em seguida, esta amostra, acondicionada em tubo eppendorf, foi pré-fixada em solução Karnovisk (0,1M) durante 2 horas, e armazenada em solução tampão Cacodilato de Sódio (0,1M), em geladeira. Depois, foi pós-fixada em Tetróxido de Ósmio (1%) mais Ferrocianeto de Potássio (0,5%) por 30 minutos a 4°C. O tetróxido de ósmio reage

com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, preservando as membranas dos glóbulos de gordura que são compostas de lipoproteínas (KALAB, 2000).

Depois, cada amostra foi lavada com água destilada para a retirada do excesso de cada reagente usado. Em seguida, foi distribuída em lamínulas de vidro (24 x 24mm), acomodada em suporte próprio e imersa em concentrações crescentes de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, duas vezes) por 15 minutos cada, para a total desidratação das amostras. As lamínulas foram colocadas em suporte (*Stub*) fixadas com fita carbono e metalizadas com ouro (Sputer Coater, SCD-050, Balzers).

As micrografias foram elaboradas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Field Emission Scanning Electron Microscope, JSM-7001F, Jeol). Foram capturadas cinco imagens de cada grupo experimental a 10kV com ampliação de aproximadamente 2,5 mil vezes. Para caracterizar os glóbulos de gordura, com a finalidade de comparar o tamanho de acordo com os diferentes grupos experimentais, foram feitas medições de 72 glóbulos de cada amostra. A contagem foi realizada no Software ImageJ 1.50b (domínio público do National Institute of Health, USA). A medição foi feita utilizando a ferramenta da correlação entre *pixels* e micrômetros, utilizando a escala da micrografia das amostras. Dos dados obtidos foi calculada a frequência de distribuição do tamanho das partículas medidas. Os gráficos foram feitos em GraphiPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc) e foi realizada a estatística de correlação não linear (Gaussiana).

Os diâmetros dos glóbulos de gorduras foram expressos como $D_{3,2}$ (Diâmetro de Sauter ou Diâmetro Superficial Médio), $D_{4,3}$ (Diâmetro de Brouckere ou Diâmetro Volumétrico Médio) e \bar{D} (Diâmetro Numérico Médio). Os valores de $D_{3,2}$, $D_{4,3}$ e \bar{D} foram obtidos pelas Equações 1, 2 e 3, respectivamente.

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad \text{Equação 1}$$

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad \text{Equação 2}$$

$$\bar{D} = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i} \quad \text{Equação 3}$$

Em que,

n_i = número de glóbulos de gordura;

d_i = diâmetro do glóbulo de gordura.

5.3 Tratamento Estatístico

O experimento que tratou do perfil de ácidos graxos, foi conduzido no delineamento de blocos casualizados, com três repetições, em triplicata, totalizando 11 tratamentos. Cada uma das 10 fórmulas infantis correspondeu a um tratamento. O tratamento correspondente ao leite humano foi utilizado para comparação com os dados referentes às fórmulas infantis. Inicialmente, os dados de teor de lipídios e do perfil lipídico foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$). Quando houve diferença significativa, realizou-se o teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o software Assistat 7.6.

Com relação a análise das características físicas dos glóbulos de gordura, inicialmente foi calculada a frequência de distribuição do tamanho dos glóbulos. Os gráficos foram feitos em GraphiPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc) e foi realizada a estatística de correlação não linear (Gaussiana). Utilizou-se estatística descritiva para as variáveis $D_{3,2}$, $D_{4,3}$. Quanto a variável \bar{D} , inicialmente realizou-se análise de variância e posteriormente o Teste de Scheffé a 1% de probabilidade, utilizando-se o software Statplus v5 AnalystSoft Inc.

6. RESULTADOS

Os valores médios para a fração lipídica em fórmulas infantis para lactentes e no leite humano estão descritos na Tabela 5. Com relação ao leite humano, observou-se haver diferença significativa entre os valores relativos à fração lipídica em fórmulas infantis, com uma variação entre 2,60g/100g e 4,27g/100g ($p < 0,05$).

Os valores médios para a fração lipídica nas fórmulas infantis FIR e FIPSLPH, equivalentes a 4,23g/100g e 4,27g/100g, foram superiores ao valor obtido para o leite humano, enquanto as fórmulas infantis FIS e FIPRNBP tiveram valores médios iguais a 2,60g/100g e 2,77g/100g, respectivamente, inferiores ao do leite humano. O teor de lipídios totais das fórmulas infantis FIPRNBP e FIS foi significativamente diferente ($p < 0,05$) dos valores obtidos para as demais fórmulas infantis.

Sobre as frações de ácidos graxos saturados (Tabela 6), verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o ácido cáprico (C10:0) na fórmula infantil FIPEH; para o ácido mirístico (C14:0) nas fórmulas infantis FIASPLVM e FIPEH; para o ácido palmítico (C16:0) nas fórmulas infantis FIPRNBP, FIASPLVM, FIPEH e FIPSLPH; para o ácido esteárico todas as fórmulas infantis analisadas diferiram significativamente do leite humano. O ácido caprílico (C8:0) não foi detectado no leite humano, todavia, foi quantificado em todas as fórmulas infantis. As fórmulas FIPEH, FIASPLVM e FIPRNBP se destacaram como as de maiores valores médios, equivalentes a 13,67g/100g, 7,21g/100g e 4,32g/100g, respectivamente. Para o ácido cáprico (C10:0), a fórmula infantil FIPEH apresentou o maior valor médio, equivalente a 13,81g/100g. A soma dos valores médios dos ácidos caprílico e cáprico correspondeu a 27,48g/100g e 14,84g/100g dos ácidos graxos presentes nas fórmulas infantis FIPEH e FIASPLVM, respectivamente. As fórmulas infantis FIPEH e FIASPLVM apresentaram os menores valores médios para as frações de ácido láurico (C12:0) e de ácido mirístico (C14:0). Quanto ao ácido palmítico (C16:0), as fórmulas infantis FILL, FIS, FIPIS e FIEAPG, tiveram valores médios equivalentes a 22,10g/100g, 20,79g/100g, 19,88g/100g e 19,53g/100g, respectivamente, estatisticamente iguais ($p > 0,05$) ao do leite humano.

Para a fração de ácido esteárico (C18:0), observou-se, com relação ao leite humano, haver diferença significativa ($p < 0,05$) em todas as amostras de fórmulas

infantis analisadas, que, por sua vez, foram significativamente iguais ($p > 0,05$). O percentual de ácido esteárico variou entre 4,38% e 5,89%; no leite humano o valor percentual determinado foi de 10,26%. Quanto ao ácido araquídico (C20:0), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores médios obtidos nas fórmulas infantis e no leite humano. Em geral, os valores médios percentuais obtidos para o ácido araquídico estiveram entre 0,20% e 0,66%. O ácido heneicosanoico (C21:0) foi detectado somente na fórmula infantil FIP e no leite humano e foram significativamente iguais. O ácido behênico (C22:0) não foi detectado na fórmula infantil FIS, nem no leite humano. Os valores percentuais médios estiveram entre 0,08% e 0,82%. As fórmulas infantis FIIL e FIPIS diferiram estaticamente das demais (Tabela 6).

Quanto ao perfil de ácidos graxos monoinsaturados (Tabela 7), verificou-se, com relação ao leite humano, que todas as fórmulas infantis analisadas diferiram estatisticamente para a fração de ácido palmitoleico (C16:1). Quando comparadas entre si, estas amostras de fórmulas infantis foram significativamente iguais. O leite humano apresentou o maior valor médio desse nutriente, equivalente a 3,73% ($p < 0,05$), enquanto nas fórmulas infantis os valores médios permaneceram entre 0,03% e 0,26%. Apenas na fórmula infantil FIS o ácido palmitoleico não foi detectado.

Para a fração de ácido oleico (C18:1), apenas as fórmulas infantis FIR, FIASPLVM e FIPSLPH mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$), com relação ao leite humano e quando comparadas às outras fórmulas infantis.

Com relação ao ácido oleico (C18:1) presente nas fórmulas infantis, obtiveram-se valores percentuais superiores a 30,18%. Nas fórmulas infantis FIR, FIPSLPH e FIASPLVM foram obtidos valores médios iguais a 45,52%, 43,95% e 43,83%, respectivamente. Esses valores são estatisticamente superiores ($p < 0,05$) ao obtido no leite humano, equivalente a 27,94%.

Tabela 5: Teor de lipídios expressos em g/100ml e g/100kcal em fórmulas infantis para lactentes e no leite humano

Classificação	Fórmula infantil para lactentes	Teor de lipídios (em g/100 mL)	Teor de lipídios em (g/100kcal)*
Fórmula infantil para lactentes	FIR	4,23±0,21 a	6,30
	FIP	3,95±0,05 ab	5,88
	FIPRNBP	2,77±0,35 cd	3,46
	FIEAPG	3,50±0,26 b	5,24
Fórmulas infantis de seguimento para lactentes	FIS	2,60±0,17 d	3,83
Fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas	FIASPLVM	4,10±0,10 ab	5,75
	FIIL	3,93±0,06 ab	5,91
	FIPIS	4,06±0,51 ab	6,02
	FIPEH	3,43±0,06 bc	5,20
	FIPSLPH	4,27±0,06 a	6,33
Leite Humano		3,44±0,50 bc	

FIR – Fórmula Infantil de Rotina; FIP – Fórmula Infantil de Partida; FIPRNBP – Fórmula Infantil para Prematuros e Recém-Nascidos de Baixo Peso; FIEAPG – Fórmula Infantil Espessada com Amido Pré-Gelatinizado; FIS – Fórmula Infantil de Seguimento; FIASPLVM – Fórmula Infantil Elementar para Alergia Severa a Proteínas do Leite de Vaca e a Múltiplos Alimentos; FIIL – Fórmula Infantil Isenta de Lactose; FIPIS – Fórmula Infantil à Base de Proteína Isolada de Soja; FIPEH - Fórmula Infantil à Base de Proteína Extensamente Hidrolisada do Soro do Leite; FIPSLPH – Fórmula Infantil à Base de Proteínas de Soro de Leite Parcialmente Hidrolisadas.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Cálculo realizado a partir do valor energético declarado no rótulo do produto.

Tabela 6: Percentual de ácidos graxos saturados em fórmulas infantis para lactentes e no leite humano

Ácidos graxos	Fórmula infantil para lactentes – % (g/100g)										Leite Humano
	FIR	FIP	FIPRNBP	FIEAPG	FIS	FIASPLVM	FIIL	FIPIS	FIPEH	FIPSLPH	
C 8:0	0,87±0,51b	0,68±0,34b	4,32±1,03b	0,82±0,72b	0,15±0,13b	7,21±6,31ab	0,63±0,31b	1,63±0,09b	13,67±7,82a	1,05±1,22b	ND
C 10:0	0,76±0,72b	2,68±2,16b	3,83±0,95b	0,82±0,71b	0,40±0,18b	7,63±6,17ab	0,66±0,40b	1,42±0,19b	13,81±6,99a	1,22±0,83b	1,37±0,71b
C 12:0	5,95±1,53ab	8,55±3,15ab	10,96±0,89ab	17,32±9,98a	9,90±0,16ab	3,29±5,17b	8,39±0,85ab	12,36±3,11ab	2,03±3,42b	11,36±2,19ab	6,41±2,17ab
C 14:0	4,11±1,60abc	4,38±1,71abc	5,53±0,20abc	4,40±1,22abc	4,12±0,26abc	1,69±2,58bc	4,39±0,62abc	5,07±0,40abc	1,27±1,93c	5,85±0,99ab	6,17±2,33a
C 16:0	16,02±1,75bcd	19,18±1,72abc	14,53±0,38cd	19,53±2,02abc	20,79±0,33ab	8,18±1,99e	22,10±0,40a	19,88±0,84 abc	12,02±4,93de	10,47±0,12de	20,19±1,33ab
C 18:0	5,89±1,19b	5,43±0,38b	4,81±0,05b	4,62±0,49b	4,38±0,21b	5,88±1,19b	5,07±0,41b	5,42±2,64b	5,24±1,37b	5,03±0,23b	10,26±1,82a
C 20:0	0,28±0,48a	0,66±0,20a	0,42±0,07a	0,60±0,16a	0,25±0,07a	0,31±0,38a	0,27±0,28a	0,56±0,26a	0,63±0,10a	0,20±0,35a	0,14±0,21a
C 21:0	ND	0,24 ± 0,34a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,89 ± 0,49a
C 22:0	0,29±0,27ab	0,50±0,28ab	0,42±0,20ab	0,17±0,15ab	ND	0,66±0,59ab	0,09±0,08b	0,13±0,18b	0,23±0,25ab	0,82±0,20a	ND
Total	34,16	42,30	44,82	48,27	39,99	34,84	41,60	46,46	48,91	36,01	45,42

Fórmula infantil para lactentes: FIR; FIP; FIPRNBP; FIEAPG.

Fórmula infantil de seguimento para lactentes: FIS.

Fórmula infantil para lactentes destinada a necessidades dietoterápicas específicas: FIASPLVM; FIIL; FIPIS; FIPEH; FIPSLPH;

FIR – Fórmula Infantil de Rotina; FIP – Fórmula Infantil de Partida; FIPRNBP – Fórmula Infantil para Prematuros e Recém-Nascidos de Baixo Peso; FIEAPG – Fórmula Infantil Espessada com Amido Pré-Gelatinizado; FIS – Fórmula Infantil de Seguimento; FIASPLVM – Fórmula Infantil Elementar para Alergia Severa a Proteínas do Leite de Vaca e a Múltiplos Alimentos; FIIL – Fórmula Infantil Isenta de Lactose; FIPIS – Fórmula Infantil à Base de Proteína Isolada de Soja; FIPEH - Fórmula Infantil à Base de Proteína Extensamente Hidrolisada do Soro do Leite; FIPSLPH – Fórmula Infantil à Base de Proteínas de Soro de Leite Parcialmente Hidrolisadas.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

C 8:0 – Ácido Caprílico; C 10:0 – Ácido Cáprico; C 12:0 – Ácido Láurico; C 14:0 – Ácido Mirístico; C 16:0 – Ácido Palmítico; C 18:0 – Ácido Esteárico; C 20:0 – Araquídico; C 21:0 – Ácido Heneicosanoico; C 22:0 – Ácido Behênico.

ND – Não detectado pelo método utilizado.

Quanto ao ácido linoleico (C18:2), não houve diferença significativa entre os valores obtidos para as diferentes fórmulas infantis e no leite humano ($p > 0,05$). Os valores percentuais variaram entre 15,89% e 21,15% e no leite humano foi igual (21,44%). Também não se detectou diferença significativa ($p > 0,05$) para a fração de ácido linolênico (C18:3) com relação ao leite humano e entre as fórmulas infantis analisadas. Os valores percentuais médios estiveram entre 0,12% e 0,82%. O ácido eicosanoico foi quantificado somente na fórmula infantil FIEAPG e no leite humano, com valores percentuais médios equivalentes a 0,10g/100g e 0,89g/100g, respectivamente, significativamente iguais ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Em todas as fórmulas infantis analisadas, a soma dos valores percentuais médios referentes aos ácidos graxos insaturados foi superior a 51,00%. A soma dos valores percentuais médios para as frações de ácidos graxos insaturados, das fórmulas infantis FIR, FIASPLVM e FIS, foi igual a 65,85%, 65,16% e 60,02%, respectivamente. No leite humano, a soma dos valores médios referentes aos ácidos graxos insaturados foi igual a 54,58%. Tem-se, ainda, que nas fórmulas infantis FIPEH e FIPIS, os ácidos graxos poli-insaturados representaram 40,88% e 39,18% do total de ácidos graxos insaturados. No leite humano, os ácidos graxos poli-insaturados representaram 40,34% e 39,18% do total de ácidos graxos insaturados.

É possível ainda relacionar o perfil das frações de ácidos graxos mais relevantes nas fórmulas infantis analisadas e considerar a influência das fontes lipídicas utilizadas em cada fórmula infantil (Tabela 4) na composição em ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados de tais fórmulas infantis para lactentes (Tabela 8). Os valores percentuais obtidos para as frações dos ácidos oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) se devem ao uso dos óleos de canola e de milho na formulação das fórmulas infantis analisadas, enquanto os óleos de girassol, prímula e soja se configuram como fontes de ácido linoleico (C18:2), e o óleo de palma como fonte de ácido palmítico (C16:0).

Tabela 7: Percentual de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados em fórmulas infantis para lactentes e no leite humano

Ácidos Graxos	Fórmula infantil para lactentes - % (g/100g)										Leite Humano
	FIR	FIP	FIPRNBP	FIEAPG	FIS	FIASPLVM	FIIL	FIPIS	FIPEH	FIPSLPH	
C 16:1	0,20±0,35b	0,26±0,05b	0,23±0,03b	0,15±0,13b	ND	0,07±0,13b	0,04±0,07b	0,25±0,12b	0,03±0,05b	0,07±0,13b	3,73±1,37a
C 18:1	45,52±8,12a	38,16±9,04ab	38,44±2,38ab	34,42±7,97ab	40,06±1,16ab	43,93±8,44a	36,86±2,15ab	32,32±3,99ab	30,18±2,61b	43,95±4,71a	27,94±2,29b
C 18:2	19,81±0,84a	18,74±2,54a	15,89±0,49a	16,65±3,02a	19,84±0,53a	20,87±2,80a	21,15±0,32a	20,71±2,40a	20,07±2,51a	19,46±1,53a	21,44±3,63a
C 18:3	0,32±0,55a	0,54±0,27a	0,61±0,05a	0,40±0,35a	0,12±0,10a	0,29±0,50a	0,35±0,30a	0,27±0,02a	0,82±0,36a	0,52±0,26a	0,58±0,38a
C 20:1	ND	ND	ND	0,10±0,18a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,89±0,29a
Total (AGMI)	45,72	38,42	38,67	34,67	40,06	44,00	36,90	32,57	30,21	44,02	32,56
Total (AGPI)	20,13	19,28	16,50	17,05	19,96	21,16	21,50	20,98	20,89	19,98	22,02
Total	65,85	57,70	55,17	51,72	60,02	65,16	58,40	53,55	51,10	64,00	54,58

Fórmula infantil para lactentes: FIR; FIP; FIPRNBP; FIEAPG.

Fórmulas infantis de seguimento para lactentes: FIS.

Fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas: FIASPLVM; FIIL; FIPIS; FIPEH; FIPSLPH;

FIR – Fórmula Infantil de Rotina; FIP – Fórmula Infantil de Partida; FIPRNBP – Fórmula Infantil para Prematuros e Recém-Nascidos de Baixo Peso; FIEAPG – Fórmula Infantil Espessada com Amido Pré-Gelatinizado; FIS – Fórmula Infantil de Seguimento; FIASPLVM – Fórmula Infantil Elementar para Alergia Severa a Proteínas do Leite de Vaca e a Múltiplos Alimentos; FIIL – Fórmula Infantil Isenta de Lactose; FIPIS – Fórmula Infantil à Base de Proteína Isolada de Soja; FIPEH - Fórmula Infantil à Base de Proteína Extensamente Hidrolisada do Soro do Leite; FIPSLPH – Fórmula Infantil à Base de Proteínas de Soro de Leite Parcialmente Hidrolisadas.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

C 16:1 – Ácido Palmítico; C 18:1 – Ácido Oleico; C 18:2 – Ácido Linoleico; C 18:3 – Ácido Linolênico; C 20:1 – Ácido Eicosanoico.

ND – Não detectado pelo método utilizado.

Tabela 8: Perfil lipídico das fórmulas infantis e respectivos valores percentuais de ácidos graxos dos óleos indicados na lista de fontes lipídicas das fórmulas infantis para lactentes analisadas

Classificação	Produto	Composição em ácidos graxos dos componentes da fração lipídica (%)				
		Óleo de canola	Óleo de girassol	Óleo de palma	Óleo de coco	
Fórmula infantil para lactentes	FIR	Óleo de canola	Óleo de girassol	Óleo de palma	Óleo de coco	-
	C16:0 – 16,02	C16:0 - 3,75	C16:0 - 5,70	C16:0 - 42,70	C16:0 - 10,08	-
	C18:0 – 05,89	C18:0 - 1,87	C18:0 - 4,79	C18:0 - 4,55	C18:0 - 4,31	-
	C18:1 – 45,52	C18:1 - 62,41	C18:1 - 15,26	C18:1 - 39,37	C18:1 - 7,45	-
	C18:2 – 19,81	C18:2 - 20,12	C18:2 - 71,17	C18:2 - 10,62	C18:2 - 1,80	-
	FIP	Óleo de palma	Óleo de palmiste	Óleo de canola	Óleo de milho	-
	C16:0 – 19,18	C16:0 - 42,70	C16:0 - 8,65	C16:0 - 3,75	C16:0 - 10,47	-
	C18:0 – 05,43	C18:0 - 4,55	C18:0 - 2,27	C18:0 - 1,87	C18:0 - 2,02	-
	C18:1 – 38,16	C18:1 - 39,37	C18:1 - 16,46	C18:1 - 62,41	C18:1 - 24,23	-
	C18:2 – 18,74	C18:2 - 10,62	C18:2 - 2,76	C18:2 - 20,12	C18:2 - 60,38	-
	FIPRNBP	Óleo de palma	Óleo de coco	Óleo de canola	Óleo de girassol	Óleo de primula
	C16:0 – 14,53	C16:0 - 42,70	C16:0 - 10,08	C16:0 - 3,75	C16:0 - 5,70	C16:0 - 5,47
	C18:0 – 04,81	C18:0 - 4,55	C18:0 - 4,31	C18:0 - 1,87	C18:0 - 4,79	C18:0 - 1,83
	C18:1 – 38,44	C18:1 - 39,37	C18:1 - 7,45	C18:1 - 62,41	C18:1 - 15,26	C18:1 - 7,50
	C18:2 – 15,89	C18:2 - 10,62	C18:2 - 1,80	C18:2 - 20,12	C18:2 - 71,17	C18:2 - 74,0
	FIEAPG	Óleo de palma	Óleo de canola	Óleo de palmiste	Óleo de milho	-
C16:0 – 19,53	C16:0 - 42,70	C16:0 - 3,75	C16:0 - 8,65	C16:0 - 10,47	-	
C18:0 – 04,62	C18:0 - 4,55	C18:0 - 1,87	C18:0 - 2,27	C18:0 - 2,02	-	
C18:1 – 34,42	C18:1 - 39,37	C18:1 - 62,41	C18:1 - 16,46	C18:1 - 24,23	-	
C18:2 – 16,65	C18:2 - 10,62	C18:2 - 20,12	C18:2 - 2,76	C18:2 - 60,38	-	
Fórmulas infantis de seguimento para lactentes	FIS	Óleo de palma	Óleo de palmiste	Óleo de canola	Óleo de milho	-
	C16:0 – 20,79	C16:0 - 42,70	C16:0 - 8,65	C16:0 - 3,75	C16:0 - 10,47	-
	C18:0 – 04,38	C18:0 - 4,55	C18:0 - 2,27	C18:0 - 1,87	C18:0 - 2,02	-
	C18:1 – 40,06	C18:1 - 39,37	C18:1 - 16,46	C18:1 - 62,41	C18:1 - 24,23	-
	C18:2 – 19,84	C18:2 - 10,62	C18:2 - 2,76	C18:2 - 20,12	C18:2 - 60,38	-

FIR – Fórmula Infantil de Rotina; FIP – Fórmula Infantil de Partida; FIPRNBP – Fórmula Infantil para Prematuros e Recém-Nascidos de Baixo Peso; FIEAPG – Fórmula Infantil Espessada com Amido Pré-Gelatinizado; FIS – Fórmula Infantil de Segmento; FIASPLVM – Fórmula Infantil Elementar para Alergia Severa a Proteína do Leite de Vaca e a Múltiplos Alimentos; FIIL – Fórmula Infantil Isenta de Lactose; FIPIS – Fórmula Infantil à Base de Proteína Isolada de Soja; FIPEH – Fórmula Infantil à Base de Proteína Extensamente Hidrolisada do Soro do Leite; FIPSLPH – Fórmula Infantil à Base de Proteína de Soro de Leite Parcialmente Hidrolisada.

Fonte: ZAMBIAZI, et al (2007) com adaptações

Tabela 8: Perfil lipídico das fórmulas infantis e respectivos valores percentuais de ácidos graxos dos óleos indicados na lista de fontes lipídicas das fórmulas infantis para lactentes analisadas (continuação)

Classificação	Produto	Composição em ácidos graxos dos componentes da fração lipídica (%)				
		O fabricante somente informa que 100% de óleos são de origem vegetal, sem detalhar as fontes.				
Fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas	FIASPLVM					
	FIIL	Óleo de palma	Óleo de canola	Óleo de coco	Óleo de girassol	-
	C16:0 – 22,10	C16:0 - 42,70	C16:0 - 3,75	C16:0 - 10,08	C16:0 - 5,70	-
	C18:0 – 05,07	C18:0 - 4,55	C18:0 - 1,87	C18:0 - 4,31	C18:0 - 4,79	-
	C18:1 – 36,86	C18:1 - 39,37	C18:1 - 62,41	C18:1 - 7,45	C18:1 - 15,26	-
	C18:2 – 21,15	C18:2 - 10,62	C18:2 - 20,12	C18:2 - 1,80	C18:2 - 71,17	-
	FIPIS	Óleo de palma	Óleo de soja	Óleo de coco	Óleo de girassol	-
	C16:0 – 19,88	C16:0 - 42,70	C16:0 - 9,90	C16:0 - 10,08	C16:0 - 5,70	-
	C18:0 – 05,42	C18:0 - 4,55	C18:0 - 3,94	C18:0 - 4,31	C18:0 - 4,79	-
	C18:1 – 32,32	C18:1 - 39,37	C18:1 - 21,35	C18:1 - 7,45	C18:1 - 15,26	-
	C18:2 – 20,71	C18:2 - 10,62	C18:2 - 56,02	C18:2 - 1,80	C18:2 - 71,17	-
	FIPEH	Óleo de canola	Óleo de girassol	Óleo de palma	-	-
	C16:0 – 12,02	C16:0 - 3,75	C16:0 - 5,70	C16:0 - 42,70	-	-
	C18:0 – 05,24	C18:0 - 1,87	C18:0 - 4,79	C18:0 - 4,55	-	-
	C18:1 – 30,18	C18:1 - 62,41	C18:1 - 15,26	C18:1 - 39,37	-	-
	C18:2 – 20,07	C18:2 - 20,12	C18:2 - 71,17	C18:2 - 10,62	-	-
	FIPSLPH	Óleo de palma	Óleo de coco	Óleo de girassol	-	-
	C16:0 – 10,47	C16:0 - 42,70	C16:0 - 10,08	C16:0 - 5,70	-	-
	C18:0 – 05,03	C18:0 - 4,55	C18:0 - 4,31	C18:0 - 4,79	-	-
	C18:1 – 43,95	C18:1 - 39,37	C18:1 - 7,45	C18:1 - 15,26	-	-
C18:2 – 19,46	C18:2 - 10,62	C18:2 - 1,80	C18:2 - 71,17	-	-	

FIR – Fórmula Infantil de Rotina; FIP – Fórmula Infantil de Partida; FIPRNBP – Fórmula Infantil para Prematuros e Recém-Nascidos de Baixo Peso; FIEAPG – Fórmula Infantil Espessada com Amido Pré-Gelatinizado; FIS – Fórmula Infantil de Segmento; FIASPLVM – Fórmula Infantil Elementar para Alergia Severa a Proteína do Leite de Vaca e a Múltiplos Alimentos; FIIL – Fórmula Infantil Isenta de Lactose; FIPIS – Fórmula Infantil à Base de Proteína Isolada de Soja; FIPEH – Fórmula Infantil à Base de Proteína Extensamente Hidrolisada do Soro do Leite; FIPSLPH – Fórmula Infantil à Base de Proteína de Soro de Leite Parcialmente Hidrolisada.

Fonte: ZAMBIAZI, et al (2007) com adaptações

Na Tabela 9 são apresentadas as características físicas dos glóbulos de gordura das amostras de fórmulas infantis para lactentes e para o *pool* de leite humano. Para as amostras das fórmulas infantis FIPRNBP (Fórmula Infantil para Prematuros e Recém-Nascidos de Baixo Peso) e FIS (Fórmula Infantil de Segmento), tais dados não foram obtidos porque não foi possível fazer a extração do lactato pela técnica adotada nesta pesquisa.

Tabela 9. Características físicas dos glóbulos de gordura das fórmulas infantis e do leite humano

Tratamento	Moda (μm)	D_{Min} (μm)	D_{Max} (μm)	$D_{3,2}$ (μm)	$D_{4,3}$ (μm)
FIR	2,20	0,60	7,00	3,47	4,08
FIP	2,00	1,20	9,60	6,13	7,05
FIEAPG	0,80	0,50	2,40	1,59	1,75
FIASPLVM	2,00	0,80	3,45	2,32	2,43
FIIL	2,40	1,00	6,20	3,70	4,45
FIPIS	0,60	0,40	1,70	0,83	0,93
FIPEH	0,80; 1,00	0,40	1,70	1,27	1,36
FIPSLPH	0,50	0,30	1,30	0,80	0,88
LH	2,60; 3,00	1,40	8,20	5,16	5,98

FIR – Fórmula Infantil de Rotina; FIP – Fórmula Infantil de Partida; FIEAPG – Fórmula Infantil Espessada com Amido Pré-Gelatinizado; FIASPLVM – Fórmula Infantil Elementar para Alergia Severa a Proteína do Leite de Vaca e a Múltiplos Alimentos; FIIL – Fórmula Infantil Isenta de Lactose; FIPIS – Fórmula Infantil à Base de Proteína Isolada de Soja; FIPEH – Fórmula Infantil à Base de Proteína Extensamente Hidrolisada do Soro do Leite; FIPSLPH – Fórmula Infantil à Base de Proteína de Soro de Leite Parcialmente Hidrolisada; LH – leite humano.

D_{Min} (μm) – diâmetro mínimo; D_{Max} (μm) – diâmetro máximo; $D_{3,2}$ (μm) - diâmetro de Sauter ou Diâmetro Superficial Médio; $D_{4,3}$ (μm) – diâmetro de Brouckere ou Diâmetro Volumétrico Médio

Considerando que amplitude é igual a diferença entre o D_{Max} (μm) e o D_{Min} (μm), a maior variação obtida, com relação ao diâmetro dos glóbulos de gordura, foi para as amostras FIP (Figura 6a) e leite humano (LM, Figura 6b), com amplitudes equivalentes a 8,40 μm e 6,80 μm , respectivamente (Tabela 9), enquanto as fórmulas infantis FIPIS (Figura 6c) e FIPSLPH (Figura 6d) apresentaram as menores amplitudes para a variação do diâmetro dos glóbulos de gordura, correspondentes a 1,30 μm e 1,00 μm , respectivamente (Tabela 9). O menor diâmetro de glóbulo de gordura foi obtido na fórmula infantil FIPSLPH, equivalente a 0,30 μm . Por outro lado, o maior diâmetro de glóbulo de gordura (9,60 μm) foi observado na fórmula infantil

FIP. Com relação ao leite humano, o maior diâmetro dos glóbulos de gordura foi equivalente a 8,20 μm .

Na figura 7 (7a; 7b; 7c; 7d; 7e) estão apresentadas as micrografias e os histogramas de distribuição de frequência do diâmetro dos glóbulos de gorduras das amostras de fórmulas infantis FIR, FIEAPG, FIASPLVM, FIIL, FIPEH, respectivamente

Com relação aos diâmetros médios dos glóbulos de gordura das fórmulas infantis expressos como $D_{3,2}$ (diâmetro médio de Sauter) e $D_{4,3}$ (diâmetro médio de Brouckere), tem-se que os menores valores foram obtidos nas fórmulas infantis FIPSLPH e FIPIS. Para a fórmula infantil FIPSLPH, os valores de $D_{3,2}$ e $D_{4,3}$ foram 0,80 e 0,88 (μm), respectivamente. A fórmula infantil FIP foi a que apresentou maiores valores de $D_{3,2}$ e $D_{4,3}$, equivalentes a 6,13 μm e 7,05 μm , respectivamente. Quanto ao leite humano, obteve-se valor de $D_{3,2}$ igual a 5,16 μm e de $D_{4,3}$ equivalente a 5,98 μm .

Na Figura 8 são apresentados os valores médios referentes ao diâmetro médio dos glóbulos de gordura das fórmulas infantis e do leite humano. Verificou-se que a fórmula infantil FIP apresenta diâmetro numérico médio dos glóbulos de gordura (3,47 μm) igual ao do leite humano (LH), de acordo com o Teste de Scheffé a 1% de probabilidade. No leite humano, diâmetro médio dos glóbulos de gordura foi equivalente a 3,44 μm . Os menores valores de diâmetro numérico médio dos glóbulos de gordura foram obtidos para as fórmulas FIEAPG, FIPEH, FIPIS, FIPSLPH, sendo equivalentes a 1,22, 1,04, 0,70 e 0,64 μm .

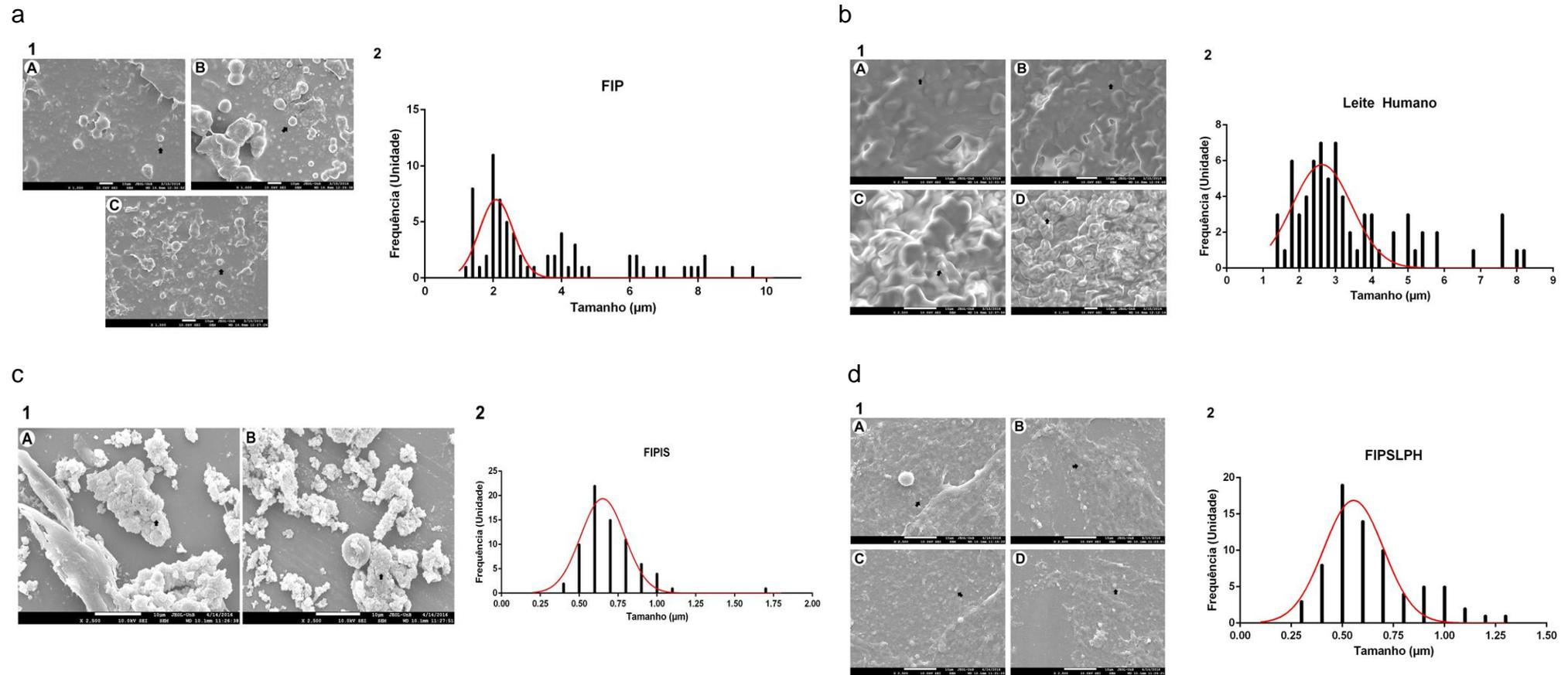


Figura 6. Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura da fórmula infantil das amostras de fórmulas infantis FIP (a), leite humano (b), FIPIS (c) e FIPSLPH (d).

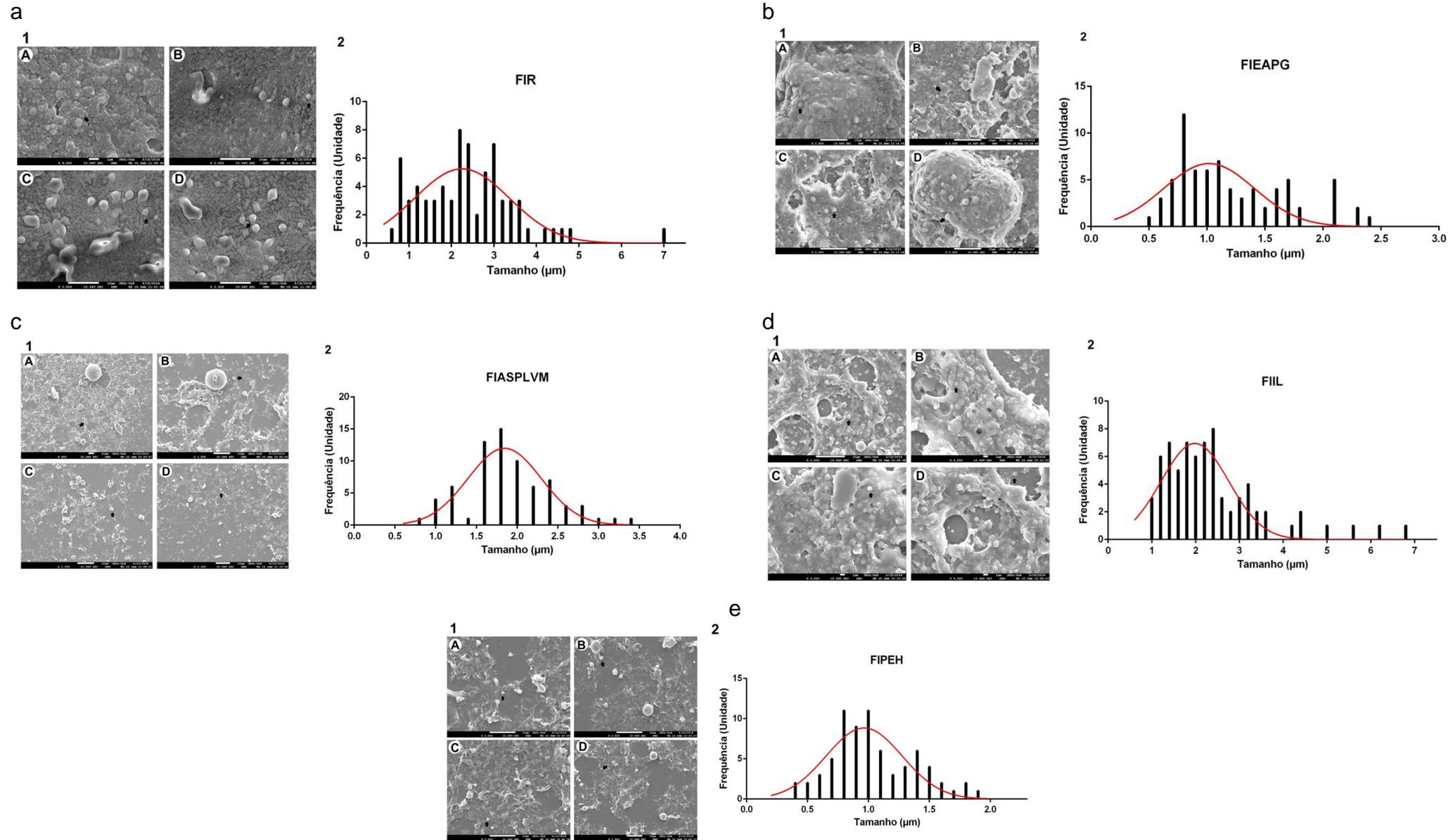


Figura 7. Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura da fórmula infantil das amostras de fórmulas infantis FIR (a), FIEAPG (b), FIASPLVM (c), FIIL (d) e FIPEH (e).

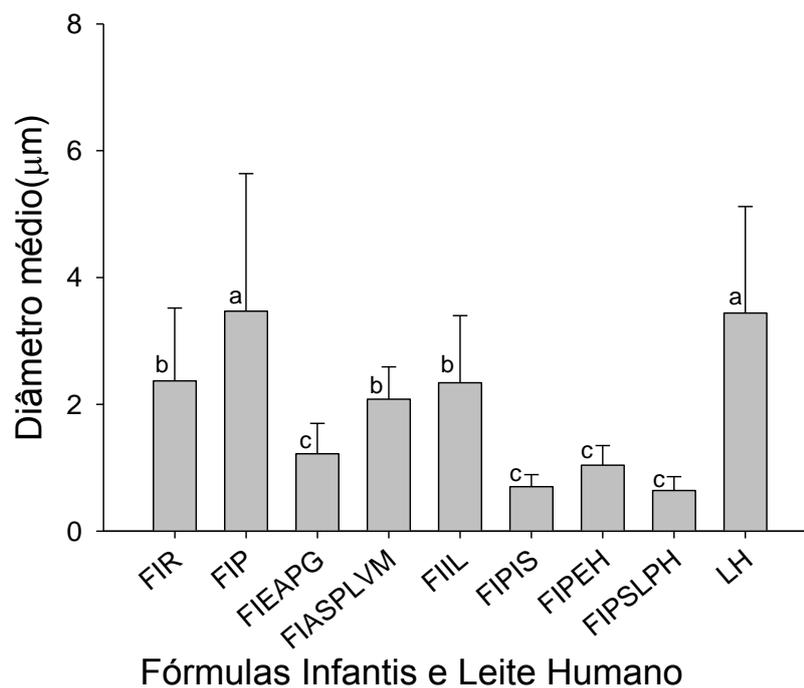


Figura 8. Diâmetro numérico médio (μm) dos glóbulos de gordura das fórmulas infantis e do leite humano.

FIR – Fórmula Infantil de Rotina; FIP – Fórmula Infantil de Partida; FIEAPG – Fórmula Infantil Espessada com Amido Pré-Gelatinizado; FIASPLVM – Fórmula Infantil Elementar para Alergia Severa a Proteínas do Leite de Vaca e a Múltiplos Alimentos; FIIL – Fórmula Infantil Isenta de Lactose; FIPIS – Fórmula Infantil à Base de Proteína Isolada de Soja; FIPEH - Fórmula Infantil à Base de Proteína Extensamente Hidrolisada do Soro do Leite; FIPSLPH – Fórmula Infantil à Base de Proteínas de Soro de Leite Parcialmente Hidrolisadas; LH – Leite Humano.

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Scheffé a 1% de probabilidade.

7. DISCUSSÃO

Os dados obtidos nesta pesquisa revelaram que 40% (n=4) e 20% (n=2) das fórmulas infantis para lactentes mostraram, respectivamente, diferença significativa com relação ao percentual de lipídios totais no leite humano e entre as fórmulas infantis analisadas. Com relação ao perfil de ácidos graxos, também se observou diferença significativa tanto em relação ao leite humano quanto entre as fórmulas infantis analisadas. Em parte, tais resultados se justificam uma vez que esses produtos foram obtidos por uma mistura de lipídios de origem vegetal e de origem animal, ou somente de origem vegetal, com ingredientes variáveis e em diferentes proporções (Tabela 4). A indústria de fórmulas infantis para lactentes objetiva, principalmente, fornecer níveis adequados dos ácidos graxos essenciais – ácidos linoleico e α -linolênico (LONG *et al.*, 2013).

Assim, o mais relevante é identificar se os produtos disponíveis no mercado atendem aos requisitos nutricionais descritos na literatura, uma vez que esses nutrientes são a principal fonte de energia para o lactente, são fundamentais para a absorção das vitaminas lipossolúveis, para a composição das membranas celulares, por fornecer componentes estruturais para a retina e cérebro, além do fato de que alguns ácidos graxos desempenham papel determinante na expressão de alguns genes (RÊGO *et al.*, 2013).

Há poucas informações na literatura sobre o teor de lipídios totais em fórmulas infantis. Riva *et al.* (2007) analisaram, com base nas informações apresentadas no rótulo dos produtos, a composição de 30 diferentes fórmulas infantis disponíveis no comércio italiano e identificaram uma variação entre 2,9g/100mL e 3,8g/100mL, ou de 4,32g/100kcal a 5g/100kcal.

Kus *et al.* (2011) determinaram o teor de lipídios em 14 amostras de fórmulas infantis disponíveis no mercado e os dados obtidos estiveram de acordo com as informações transcritas nos rótulos dessas amostras, indicando adequação em relação às normas vigentes. Rêgo *et al.* (2013) realizaram um levantamento das fórmulas infantis disponíveis no mercado português (n=87) e identificaram que a fração de lipídios totais variou, em média, entre 4,7g/100kcal e 5,3g/100kcal, enquanto para o leite humano o valor referência foi de 5,6g/100kcal. Zunin *et al.*

(2015) analisaram 32 amostras de fórmulas infantis e identificaram uma variação entre 22,9g/100g e 30,1g/100g, em base seca, para a fração de lipídios totais.

Sobre o teor de lipídios totais no leite humano, sabe-se que, em geral, a concentração de lipídios é menor no colostro do que no leite maduro e o conteúdo lipídico do leite normal aumenta, progressivamente, durante a ordenha; contudo, a fração de triacilgliceróis não sofre grandes mudanças entre as fases de lactação (GARTON, 1963; UAUY, 1990; SARKAR, 2004; COSTA & SABARENSE, 2010). De maneira geral, o teor de lipídios no leite humano varia entre 3% e 5% (JENSEN, 1999).

Trabalho realizado por Hall (1979) mostrou que o teor de lipídios totais do leite humano triplicou, na média, de 2,4g/100mL a 7,5g/100mL, durante a amamentação. Bitman *et al.* (1983) observaram que, com o avanço da lactação, o teor de lipídios aumentou em 2% três dias após o parto, na seguinte ordem: colostro, leite de transição, leite maduro. Após 3 meses, o aumento foi maior que 4%.

Variações observadas entre o teor de lipídios durante a lactação podem ser devido a diversos fatores que modulam a composição do leite humano, uma vez que, entre os macronutrientes, essa fração é a mais variável. Além disso, é possível ainda considerar que a amostragem e o método analítico adotado podem levar a obtenção de diferentes dados, assim como a forma de expressão dos nutrientes.

Assim, quanto ao percentual de lipídios totais, as amostras de fórmulas infantis para lactentes, analisadas neste estudo, estão parcialmente de acordo com a literatura e com os dados declarados nos rótulos dos produtos; para oito amostras foram detectados valores superiores aos declarados no rótulo. O teor de lipídios totais no leite humano esteve de acordo com o intervalo indicado na literatura (JENSEN, 1999; COSTA & SABARENSE, 2010; Da SILVA *et al.*, 2007).

Comparando-se ainda o teor de lipídios totais nas fórmulas infantis com o valor obtido para o *pool* de leite humano, verificou-se que 20% (n=2) das amostras apresentaram teor de lipídios totais inferiores ao do leite humano analisado e aos dados disponíveis na literatura (JENSEN, 1999; COSTA & SABARENSE, 2010; Da SILVA *et al.*, 2007).

Convém considerar que a fração lipídica do leite humano deve contribuir com 40% a 55% do total de energia consumida pelo lactente, além de contribuir para os

demais processos fisiológicos responsáveis pela saúde do lactente e, de tal forma, teores de lipídios inferiores podem favorecer a oferta de reduzidas concentrações de ácidos graxos essenciais e fornecer menor aporte calórico (JENSEN, 1999; KOLETZKO et al., 2001; COSTA & SABARENSE, 2010).

Segundo a The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), o conteúdo mínimo de lipídios totais nas fórmulas infantis deve ser de 4,4 g/100 kcal (1,05 g/100 kJ) e o máximo de 6,0 g/100 kcal (1,4 g/100 kJ). Neste estudo, as fórmulas infantis FIPRNBP e FIS tiveram uma redução de 43% e de 36%, respectivamente, na fração de lipídios totais expressa em g/100kcal. As fórmulas infantis FIR e FIPSLPH apresentaram um acréscimo em torno de 5% no teor de lipídios totais expresso em g/100kcal (KOLETZKO et al., 2005). Para Thompkinson & Kharb (2007), os valores máximo e mínimo de ingestão de lipídios, fisiologicamente tolerável para o bem estar dos lactentes, não estão bem definidos.

Quanto ao teor de ácidos graxos saturados, o ácido palmítico foi o predominante nas amostras de fórmulas infantis analisadas, com uma variação percentual entre 12,02% e 22,10%, exceto para as fórmulas FIASPLVM e FIPSLPH. Tais dados foram igualmente significativos com relação ao leite humano (Tabela 2). López-López et al. (2002) determinaram o perfil de ácidos graxos em 11 fórmulas infantis e os dados obtidos para a fração de ácido palmítico variaram de 17,96% a 27,42%; no *pool* de amostras de leite humano, o valor obtido foi de 19,48%; esses autores descreveram ainda que o ácido palmítico diminuiu significativamente da fase de colostro para a fase de leite maduro.

COSTA & SABARENSE (2010) mostraram uma variação entre 17,30% e 25,14% para a fração de ácido palmítico (C16:0) em amostras de leite humano analisadas em diferentes países (Tabela 03). A literatura relata que a composição do leite humano é afetada pelo estágio de lactação e por fatores individuais das nutrizes. Adiposidade e mudanças nos hábitos alimentares pareceram influenciar negativamente a composição do leite dessas mulheres (YAMAWAKI et al., 2005).

A presença de ácido palmítico (C16:0) no leite humano assegura maior digestibilidade e uso desse nutriente como fonte energética, gerando outros ácidos graxos, podendo ainda ser estocado pelo lactente. Além disso, por não ser essencial, o ácido palmítico também pode ser sintetizado pelo organismo humano

(JENSEN, 1999; COSTA & SABARENSE, 2010; OLEYNIK et al., 2013; BORGIO et al, 2015).

Todavia, no leite humano, a esterificação ocorre na posição *sn-2* (ou β) do triglicerídeo, permitindo que as lipases pancreáticas hidrolisem seletivamente os ácidos graxos nas posições *sn-1* e *sn-3* produzindo *sn-2* monoacilgliceróis e ácidos graxos livres que são absorvidos, reesterificados e secretados no plasma. O posicionamento dos ácidos graxos saturados, particularmente do ácido palmítico na posição *sn-2*, torna tanto os ácidos graxos na forma de *sn-2* monoacilgliceróis e o cálcio do leite completamente absorvidos (BORGIO, et al 2015). Aproximadamente 60% do total de ácido palmítico (C16:0), no leite humano, se encontra na posição *sn-2* do triacilglicerol, o que garante maior facilidade na absorção (COSTA & SABARENSE, 2010). Tal fato se deve a maior polaridade e solubilidade em água do monoacilglicerol com o ácido palmítico na posição *sn-2* em relação à sua forma livre (KOLETZKO et al, 2001; LÓPEZ-LÓPEZ et al, 2001; JENSEN, 1999; THOMPSON & KHARB, 2007).

Faz-se necessário considerar que, nas fórmulas infantis para lactentes, a fração lipídica é principalmente constituída por óleos de origem vegetal (COSTA & SABARENSE, 2010). De tal forma, o ácido palmítico está predominantemente esterificado nas posições *sn-1* (ou α) e *sn-3* (ou α') e, assim, o ácido palmítico livre liga-se ao cálcio e torna-se insolúvel no intestino e, portanto, não é absorvido, e é eliminado nas fezes (BORGIO, et al 2015).

Pesquisa realizada por López-López et al. (2002) mostrou o percentual de ácidos graxos na posição *sn-2* em amostras de leite humano e de fórmulas infantis. Os dados obtidos mostraram que de 7,33% a 62,33% do ácido palmítico estavam na posição *sn-2*, enquanto no leite humano a relação foi de 87,86% do ácido palmítico na posição *sn-2*. Straarup et al (2006) descreveram a composição e a esteroespecificidade dos ácidos graxos em 28 fórmulas infantis e identificaram que o percentual de ácido palmítico na posição *sn-2* variou de 0,4% a 10,1%.

A segunda fração, quantitativamente mais importante, foi a do ácido láurico (C12:0), com uma variação média entre 2,03g/100g e 17,32g/100g, não diferindo significativamente do valor determinado para a *pool* de amostras do leite humano. Costa & Sabarense (2010) mostraram uma variação entre 5,21% e 13,82% em

amostras de leite humano analisadas em diferentes países (Tabela 03), enquanto López-López et al. (2002) identificaram valores entre 5,65% e 12,64%.

Sobre a soma dos ácidos láurico (C12:0) e mirístico (C14:0), verificou-se que apenas a fórmula infantil FIEAPG teve a soma dos valores percentuais superior a 20% do conteúdo total de ácidos graxos (Tabela 6); as demais estiveram de acordo com recomendações da ESPGHAN (KOLETZKO et al., 2005). Pesquisas realizadas na Itália com 32 fórmulas infantis e na Espanha com 11 fórmulas infantis identificaram que a soma dos percentuais de ácido láurico e ácido mirístico nas amostras analisadas foi menor que 20% do total de ácidos graxos (ZUNIN et al., 2015; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2002).

Quanto ao teor de ácidos graxos saturados, verificou-se que a soma dos percentuais de ácidos graxos saturados para as fórmulas infantis estiveram de acordo com a literatura, que destaca uma variação de 28,70% a 48,99% para a fração de ácidos graxos saturados no leite humano (COSTA & SABARENSE, 2010) e de 34,18% a 47,48% (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2002).

Quanto ao teor médio percentual de ácidos graxos com potencial hipercolesterolêmico, a soma das frações de ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0) e ácido palmítico (C16:0) nas amostras de fórmulas infantis variou de 13,16% a 41,25%. López-López et al. (2002) encontraram valores superiores a 30g/100g nas 11 amostras de fórmulas infantis analisadas.

No *pool* de leite humano, o valor obtido para a soma do percentual desses ácidos graxos foi de 32,77%. Dados da literatura indicam valores 22% e 42% e valores de 28,8% para a soma dessas frações de ácidos graxos saturados (JENSEN et al., 1999; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2002).

A gordura saturada (C12:0, C14:0 e C16:0) eleva a concentração plasmática de colesterol, especialmente o C14:0, enquanto o C18:0 é neutro em seus efeitos sobre o colesterol (JENSEN, 1999; SANTOS, et al, 2013). Quando consumidos em excesso, os ácidos graxos saturados podem aumentar o risco de desenvolvimento de doenças cardíacas. Carlson et al, 1997 relataram que o ácido láurico e o ácido mirístico (C14:0) são potencialmente mais colesterolêmicos.

Pesquisa realizada por Kus et al. (2011), sobre informações nutricionais contidas no rótulo dos produtos, mostrou que entre 14 amostras analisadas de

fórmulas infantis para lactentes, apenas uma fórmula infantil para lactentes apresentou valor 38% ($13,1 \pm 1,2\text{g}/100\text{g}$, em base seca) maior que o informado no rótulo. Oleynik et al. (2013) compararam o perfil lipídico de fórmulas infantis com o perfil lipídico do leite humano e os dados obtidos mostraram que, para o ácido láurico (C12:0), os valores obtidos variaram entre 7,827 mol% a 11,340 mol%; para o ácido mirístico (C14:0), de 4,423 mol% a 5,693 mol%; e para o ácido palmítico, 8,478 mol% a 24,361 mol%. López-López et al (2002), analisando 11 fórmulas infantis, encontraram teores entre 5,19% e 12,64% para o ácido láurico (C12:0); 4,06% a 5,91% para o ácido mirístico (C14:0). Dados da literatura indicaram uma variação entre 4,1% e 7,81%; 4,05% e 9,35% para a fração de ácido láurico em amostras de leite humano (COSTA & SABARENSE, 2010; LÓPEZ-LÓPEZ et al.,2002).

Sobre a fração de ácido esteárico (C18:0), as fórmulas infantis analisadas foram igualmente significativas, com uma variação entre 0,20% a 0,66%), à amostra de leite humano (0,14%). O ácido esteárico (C18:0) é encontrado em níveis mais moderados em relação ao ácido palmítico e, no tecido humano, esse componente é rapidamente convertido em ácido oleico (C18:1) (JENSEN, 1999). López-López et al. (2002) identificaram valores entre 3,05% e 6,72%, enquanto Costa & Sabareense (2010) descreveram valores entre 4,62% e 9,78% para as amostras analisadas de leite humano em diferentes países.

É possível justificar os dados para as frações dos ácidos palmítico, láurico e mirístico, especialmente porque a composição de cada produto (Tabela 4) mostrou que a fração lipídica das fórmulas infantis analisadas era composta por óleos de origem vegetal, como os óleos de palma e de coco, ricos nesses nutrientes. Por sua vez, os triglicerídios de cadeia média (TCM) contribuíram possivelmente para os valores médios percentuais de ácido caprílico (C8:0) nas amostras das fórmulas infantis FIPRNBP (4,32%), FIASPLVM (7,21%) e FIPEH (13,81%), uma vez que as moléculas dos TCM são formadas por três ácidos graxos saturados contendo de 6 a 12 átomos de carbono, esterificados ao glicerol: ácidos caprílico (C8:0; 50%-80%), cáprico (C10:0; 20%-50%) e com uma proporção menor dos ácidos caproico (C6:0; 1%-2%) e láurico (C12:0; 1%-2%). Essa fração de ácido graxo não foi detectada no *pool* da amostra de leite humano. Interessante observar que as fontes de lipídios de

origem vegetal variam muito pouco entre as fórmulas infantis para lactentes, restando à formulação proposta por cada fabricante a justificativa para os diferentes perfis de ácidos graxos determinados nas amostras analisadas.

A soma do total de ácidos graxos monoinsaturados – palmitoleico (C16:1); oleico (C18:1) e eicosanoico (C20:1) – variou entre 30,21% e 45,72% para as fórmulas infantis analisadas, enquanto o valor obtido para o *pool* de leite humano foi de 32,56%. Quantitativamente, a fração de ácido oleico foi a maior entre todas as amostras de fórmulas infantis analisadas (30,18% a 45,52%) e o valor médio obtido para o *pool* de leite humano foi inferior ao das fórmulas infantis (27,94%) (Tabela 7).

Dados apresentados por Costa & Sabarense (2010) mostraram uma variação entre 25% e 34,50% de ácido oleico em amostras de leite humano obtidas em diferentes países, enquanto a soma dos ácidos graxos monoinsaturados variou entre 27,60% e 37,10%. López-López et al. (2002) encontraram teores de 28,30% a 43,83% de ácido oleico em amostras de leite humano e teores de 34,34% a 44,69% em 11 amostras de fórmulas infantis.

Além de propiciar reservas energéticas, entre outras funções, o ácido oleico controla a síntese de ácidos graxos de cadeia média e reduz o ponto de fusão dos triglicerídios, proporcionando a fluidez necessária à formação, transporte e metabolismo dos glóbulos de gordura. Os ácidos graxos monoinsaturados podem ser sintetizados no organismo. Sabe-se, ainda, que em função dos vários benefícios dessa fração de nutrientes, há relatos na literatura que sugerem o consumo de óleos vegetais ricos nesses compostos pelas mães (VILLALPANDO et al, 1995; TINOCO et al, 2007; COSTA & SABARENSE, 2010).

Quanto aos ácidos graxos essenciais, os dados obtidos nesta pesquisa indicaram que todas as amostras de fórmulas infantis para lactentes analisadas foram igualmente significativas entre si e com relação ao leite humano. Straarup et al. (2006) analisaram 28 fórmulas infantis e obtiveram os seguintes resultados para as frações dos ácidos graxos linoleico (C18:2n-6) e linolênico (C18:3n-3), respectivamente: 11,9% a 20,5% e 0,9% a 2,2% para produtos (n = 5) destinados a lactentes pré-termo; 5,3% a 26,0% e 0,3% a 2,0% para fórmulas (n = 5) de seguimento e de lactentes a termo; 5,3% a 26,0% e 0,3% a 2,0% para fórmulas infantis (n=11) destinadas a necessidades dietoterápicas específicas. López-López

et al. (2002) analisaram 11 fórmulas infantis e identificaram os dados a seguir: 8,93% a 18,43%, para a fração de ácido linoleico (C:18-2n-6), e 0,67% a 2,83%, para a fração de ácido linolênico (C18:3n-3). Quanto à variação desses ácidos graxos no *pool* de amostras de leite humano, o valor obtido para a fração de ácido linoleico (C18:2n-6) foi de 21,44%, concordando os intervalos de variações apresentados na literatura: 10% a 25%.

Assim, os dados obtidos para as amostras de fórmulas infantis analisadas neste estudo tendem a apresentar comportamento similar quanto à fração de ácido linoleico (C18:2n-6), e dados inferiores aos encontrados na literatura para a fração de ácido linolênico (C:18-3n-3). Segundo Koletzko et al. (2005) e Thompkinson & Kharb (2007), a fração de ácido linoleico (C18:2n6) nas fórmulas infantis, como no leite humano, deve contribuir com cerca de 7% a 20% do total de ácidos graxos, valor suficiente para cobrir as exigências mínimas para esse nutriente. Concentrações elevadas desse ácido graxo podem induzir efeitos metabólicos indesejáveis com relação ao metabolismo de lipoproteínas, função imune, equilíbrio de eicosanoides e estresse oxidativo.

Para a fração de ácido linolênico (C18:3n-9) o valor obtido foi de 0,58%; Costa & Sabareense (2010) relataram valores entre 0,49% e 1,72%; López-López et al. (2002) relataram valores médios de 0,13%; Straarup et al. (2006), 10% a 21%; Jensen et al. (1990), 14,4%. A concentração de ácido linolênico (C18:3n3) deve atingir valor mínimo de 1% do total de ácidos graxos, não tendo um limite máximo estabelecido, apesar do ácido linolênico poder aumentar o risco de oxidação lipídica produzindo rancificação e efeitos adversos na estabilidade da fórmula infantil (KOLETZKO et al., 2005; JENSEN, 1999).

A soma do total de ácidos graxos monoinsaturados variou entre 30,21% e 45,72%, enquanto a dos ácidos graxos poli-insaturados variou entre 16,50% e 21,50% nas fórmulas infantis analisadas. No *pool* de leite humano esse valor foi igual a 32,56% e 22,02%, respectivamente. No estudo de López-López et al. (2002), os valores obtidos foram de 34,94% a 45,50% para a fração de ácidos graxos monoinsaturados, e de 10,65% a 20,02% para a de ácidos graxos poli-insaturados. Para o leite humano, López-López et al. (2002) identificaram uma relação de 32,08% a 47,34% e de 13,26% a 29,15% para a soma das frações de ácidos graxos

monoinsaturados e de poli-insaturados, enquanto Costa & Sabarense (2010) relataram valores entre 27,60% e 39,30% e 10,40% e 25%, respectivamente.

A ESPGGHAN (KOLETZKO et al., 2005) não define a relação desejável para as frações de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Isso possibilita especular se a concentração de ácidos graxos saturados poderia estar próxima a do leite humano ou se poderia ser inferior. No leite humano, a relação de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados é de 45:40:15. Neste estudo, as fórmulas infantis para lactentes FIP (42,30:38,42:19,28) e FIPRNBP (44,82:38,67:16,50) foram as que mais se aproximaram desta proporção.

Para as amostras de fórmulas infantis analisadas nesta pesquisa, os valores obtidos para a relação n-6:n-3 não estão de acordo com as recomendações da ESPGGHAN (KOLETZKO et al., 2005), uma vez que os teores encontrados para a fração de ácido linolênico (C18:3n3) são inferiores a 1g/100g. Das 28 amostras de fórmulas infantis analisadas por Straarup et al. (2006) apenas 4 fórmulas infantis não atenderam a esse critério, enquanto as 11 amostras analisadas por López-López et al. (2002) atenderam as recomendações sobre a composição de ácidos graxos essenciais estabelecidas pela ESPGGHAN (KOLETZKO et al., 2005). Riva *et al.*, 2007 e Kus et al., 2011 verificaram que, em 16 amostras, os teores de ácido linoleico estavam de acordo com o recomendado pela União Europeia, assim como a razão n-6:n-3.

A literatura recomenda uma relação de ácido linoleico (C18:2n6) para ácido linolênico (C18:3n3) de 5 a 15, pois se sabe que as séries de ácidos graxos (n-3, n-6, n-7 e n-9) competem entre si pelas vias metabólicas de alongamento e dessaturação e tal harmonia é importante para o equilíbrio adequado para a produção dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa – ARA, DHA, EPA – e adequado funcionamento do organismo (COSTA & SABARENSE, 2010; RIVA et al, 2007; LAURITZEN et al., 2001).

Assim, a relação n-6/n-3 é um importante indicador da qualidade nutricional de fórmulas infantis para lactentes (COSTA & SABARENSE, 2010; SIMOPOULOS, 2002). O leite humano tem uma relação n-6/n-3 (5:1 – 10:1) que previne tanto o excesso de ácido linoleico quanto a redução da síntese de DHA (RIVA et al, 2007).

Os ácidos graxos essenciais são precursores dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa das séries n-3 e n-6, originando, entre eles os ácidos araquidônico ARA (20:4 n-6), eicosapentaenoico EPA (20:5 n-3) e docosahexaenoico DHA 22:6 n-3 (KUS & MANCINI-FILHO, 2010).

O ácido araquidônico é o metabólico mais importante do ácido linoleico nos tecidos animais, tanto do ponto de vista quantitativo quanto biológico. Geralmente, é o ácido graxo poli-insaturado mais abundante na fração de fosfolípidios e precursor de várias famílias de eicosanoides, como as prostaglandinas da série 2 (PG₂), tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas (mediadores anti-inflamatórios) (CRISTIE, 1989, 2010). Os ácidos graxos araquidônico e docosahexaenoico são os principais componentes da membrana fosfolipídica das células e são os ácidos graxos poli-insaturados predominantes no sistema nervoso central. O ácido docosahexaenoico é o ácido graxo mais abundante na membrana fotorreceptora da retina (KUS & MANCINI-FILHO, 2010).

O colostro é mais rico em ácidos graxos insaturados que o leite maduro, estando também presentes em maior concentração no colostro e no leite maduro de mães de crianças pré-termo. No entanto, a concentração de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa do leite humano diminui rapidamente depois de três meses após o parto (BELDA; POURCHET-CAMPOS, 1991).

Considerando-se as informações disponíveis sobre a composição das fórmulas e perfil de ácidos graxos (Tabela 8), observou-se a importante contribuição dos óleos de prímula, girassol, milho e soja no valor percentual do ácido linoleico nas fórmulas infantis para lactentes analisadas.

Quanto às micrografias, os dados obtidos para a variação modal dos glóbulos de gordura das amostras de fórmulas infantis analisadas (0,5µm – 2,40µm) (Tabela 9) mostraram que esta variou, possivelmente, em função da composição química das amostras e das operações unitárias envolvidas no processamento. Para o *pool* de leite humano, os dados estiveram de acordo com a literatura, que preconiza uma variação entre 0,35µm e 13µm, com um diâmetro médio de 5µm, com área superficial de 2m²/g de gordura (LOPEZ & MENARD, 2011).

Estas variações observadas se devem ao fato de que os glóbulos de gordura se apresentam polidispersos e com diâmetros variados, formando a MGGL.

Pesquisa realizada em fórmulas infantis à base de leite de vaca mostrou que os glóbulos de gordura foram significativamente menores que os do leite humano ($0,3\mu\text{m}$ a $0,8\mu\text{m}$), com uma elevada área superficial de 2m^2 a $4\text{m}^2/\text{g}$ de gordura. Segundo os autores, o pequeno tamanho dos glóbulos de gordura encontrados em fórmulas lácteas infantis resultou da etapa de homogeneização, cuja pressão aplicada objetiva formar pequenos glóbulos, de tamanho inferior a $1\mu\text{m}$, para assegurar a estabilidade física da emulsão durante o tempo de armazenamento e a reconstituição do produto. Além disso, outras variáveis nos parâmetros tecnológicos (concentração, evaporação, desidratação, composição química) utilizados pelos diferentes fabricantes podem justificar as diferenças observadas no tamanho dos glóbulos de gordura desses produtos (LOPEZ & MENARD, 2011).

Lopez & Menard (2011) mostraram que a composição da interface dos triacilgliceróis/água também foi diferente entre os glóbulos de gordura do leite humano e os glóbulos de gordura de fórmulas infantis. Nas fórmulas lácteas infantis, os glóbulos de gordura são cobertos principalmente por proteínas do leite, enquanto glóbulos de gordura do leite humano são envolvidos por lipídios polares e proteínas, formando a chamada MGGL. Em algumas das amostras de fórmulas infantis analisadas por estes pesquisadores, os dados revelaram também a presença de agregados de proteínas ou de complexos formados entre glóbulos de gordura e proteínas, provavelmente induzidos pela desnaturação térmica das proteínas durante o processamento, que podem de certa forma comprometer a digestão e absorção destes nutrientes (LOPEZ & MENARD, 2011).

Os dados obtidos para o Diâmetro Superficial Médio¹ ($D_{3,2}$) e para o Diâmetro Volumétrico Médio² ($D_{4,3}$) indicaram também que a amostra FIP ($D_{3,2} = 6,13\mu\text{m}$ e $D_{4,3} = 7,05\mu\text{m}$) foi a que apresentou glóbulos de gordura com valores de diâmetro mais próximos aos dos glóbulos de gordura do leite humano ($D_{3,2} = 5,16\mu\text{m}$ e $D_{4,3} = 5,98\mu\text{m}$), ratificando os dados obtidos quando da aplicação do Teste de Scheffé, a 1% de probabilidade.

¹ Diâmetro Superficial Médio ($D_{3,2}$) é definido como o diâmetro do glóbulo que possui a mesma razão volume/área superficial que a amostra como um todo (PEÇANHA, 2014).

² Diâmetro Volumétrico Médio ($D_{4,3}$) indica o ponto central em torno do qual gira a frequência de volume da distribuição (TONON et al., 2009).

Os menores glóbulos de gordura são, provavelmente, mais susceptíveis ao processo de digestão devido ao aumento da área superficial. Estudos mostraram que o tipo de emulsificante, bem como o tamanho dos glóbulos da emulsão, afeta a lipólise. Em lactentes prematuros, a hidrólise dos triglicerídios do leite humano foi maior do que a hidrólise dos triglicerídios de uma fórmula infantil padrão, com pequenos glóbulos de gordura revestidos por proteínas. Este efeito foi atribuído à diferença em tamanho e à camada interfacial dos glóbulos de gordura em adição aos distintos perfis de ácidos graxos existentes entre o leite humano e o de uma fórmula infantil padrão (GALLIER et al., 2015).

O tamanho do glóbulo de gordura, composição e organização da MGGL, bem como a estrutura dos triglicerídios da fração lipídica exercem forte impacto na biodisponibilidade de ácidos graxos porque são os fatores mais importantes que afetam a ação das lipases digestivas (GARCIA et al. 2014).

Considerando que as fórmulas infantis para lactentes são produtos cuja matriz alimentar difere da matriz do leite humano, que as variáveis relativas aos parâmetros tecnológicos podem ainda modificar as características físicas e químicas da monocamada de glóbulos de gordura, afetando a biodisponibilidade dos ácidos graxos e demais nutrientes, indica-se que mais estudos visando o aprofundamento das características físicas e químicas da membrana dos glóbulos de gordura de fórmulas infantis para lactentes sejam realizados para avaliar quais mudanças químicas impactariam na melhor digestibilidade e absorção de lipídios e componentes lipossolúveis de produtos tão importantes para lactentes, que, por alguma razão, não podem ser alimentados com leite humano.

8. CONCLUSÕES

Este estudo permitiu identificar o perfil dos ácidos graxos e o diâmetro dos glóbulos de gordura em um número limitado de fórmulas infantis para lactentes. Os resultados mostraram diferenças significativas para as frações de ácidos graxos saturados e monoinsaturados com relação ao leite humano e também às amostras analisadas. Apenas as frações de ácido linoleico e de ácido linolênico foram igualmente significativas entre as amostras analisadas e com relação ao leite humano, apesar dos reduzidos valores detectados para o ácido linolênico.

Com relação às micrografias dos glóbulos de gordura, foi possível identificar que as amostras de fórmulas infantis para lactentes, com exceção da amostra FIP, apresentaram diâmetros de glóbulos de gordura inferiores aos do leite humano. Considerando a formulação de cada fórmula infantil, é também possível considerar que as diferenças na composição da interface triacilgliceróis/água sejam bem distintas da MGGL.

Não obstante as diferenças observadas sobre o teor de lipídios, o perfil dos ácidos graxos e o diâmetro dos glóbulos de gordura nas fórmulas infantis para lactentes, com relação ao leite humano, a administração de fórmulas infantis é uma estratégia viável para manutenção e desenvolvimento de lactentes em situações específicas como dificuldades no processo de amamentação, secreção insuficiente de leite, mães portadoras de doenças transmissíveis, lactentes em situações fisiológicas específicas, entre muitas outras. Evidentemente, faz-se também relevante considerar os aspectos que modulam a composição destes nutrientes no leite humano.

Do ponto de vista químico, a não determinação da estrutura estereoespecífica do ácido palmítico (16:0) foi uma limitação deste estudo, visto que a maior parte desse ácido graxo presente no leite humano está localizada na posição sn2 da molécula do triacilglicerol, em contraste com o leite de vaca e com os óleos vegetais, que contêm a maior parte do citado ácido graxo nas posições mais externas das moléculas de triglicerídios.

Igualmente, observou-se ser ainda necessário propor composições de fórmulas infantis que possibilitem obter produtos com maior teor de ácido linolênico,

por ser esse ácido graxo essencial e fundamental para a produção de um dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, o DHA, essencial para muitas funções neurológicas e que, juntamente com o colesterol, pode atuar como modulador da estrutura e função das membranas.

Do ponto de vista microestrutural, aprofundar o conhecimento sobre a organização das membranas dos glóbulos de gordura na MGGL no leite humano e em fórmulas infantis para lactentes é fundamental para avaliar o potencial impacto na digestão e absorção dos nutrientes, bem como para definir estratégias tecnológicas para o desenvolvimento de fórmulas infantis com características químicas, nutricionais e microestruturais mais próximas às do leite humano.

9. REFERÊNCIAS

- ALAN, F.; WOLFSCHOON, P. Determinação do teor de gordura em queijo. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora: p. 03-13, jan-fev, 1980.
- AGOSTONI, C; HASCHKE, F. Infant formulas: recent developments and new issues. *Minerva Pediatr.* 2003;55:181-94.
- BELDA, M. C. R. & POURCHET-CAMPOS, M. A. Ácidos graxos essenciais: uma visão atualizada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas: v. 11, n 1, p.5-35, 1991.
- BENER, A.; GALADARI, S.; GILLETT, M.; OSMAN, N.; AI-TANEIJI, H.; AI-KUWAITI, M.H.H. Fasting during the holy month of Ramadan does not change the composition of breast milk. *Nutr Res.* 2001(6); 21: 859-64.
- BENSON, J.D; MASOR, M.L. Infant formula development: past, present and future. *Endocr Regul.* 1994;28:9-16.
- BERTON, A.; ROUVELLAC, S.; ROBERT, B.; ROUSSEAU, F.; LOPEZ, C.; CRENON, I. Effect of the size and interface composition of milk fat globules on their in vitro digestion by the human pancreatic lipase: native versus homogenized milk fat globules. *Food Hydrocolloids* 29:123–134. 2012.
- BITMAN, J.; WOOD, D. L.; HAMOSH, M.; HAMOSH, P.; MEHTA, N. R. Comparison of the lipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 38, n 2, p.300-312, 1983.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J.; CAN. *J. Biochem. Physiol.* 1959, 37, 911.
- BORGO, L.A. Efeitos da pasteurização e do congelamento sobre a fração lipídica do leite humano. Universidade de Brasília. Tese, 2011.
- BORGO, L.A.; ARAÚJO, W.M.C.; CONCEIÇÃO, M.H.; RESCK, I.S.; MENDONÇA, M.A. Are fat acids of human milk impacted by pasteurization and freezing? *Nutrición Hospitalaria.* 2015;31(3):1386-1393.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Brasília, DF: 2005.
- BRASIL. Resolução RDC n.43, de 19 de setembro de 2011. Regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes. *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, Brasília, DF, 21 set. 2011.
- BRASIL. Resolução RDC n.44, de 19 de setembro de 2011. Regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância. *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, Brasília, DF, 21 set. 2011.
- BRASIL. Resolução RDC n.45, de 19 de setembro de 2011. Regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas. *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, Brasília, DF, 21 set. 2011.

BUTTE, N.F.; GARZA, C.; O'BRIAN, S.; NICHOLS, B. L. Human milk intake and growth in exclusively breast-fed infants. *J Pediatr.* 1984; 104:187-95.

CALDER, P.C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? *Nutr Res.* 2001; 21(1):309-41. doi: 10.1016/S0271-5317(00) 00287-6.

CAMPOS, L.A; FEITOSA, A.R.X; PINHO, L.G.M; MELO, M.C.A. Fórmulas para lactentes: repercussões na qualidade da nutrição e saúde infantil. *Rev Pediatr.* 9(2): 59-65, jul./dez. 2008.

CARLSON, S.E.; CLANDININ, M.T.; COOK, H.W.; EMKEN, E.A.; FILER JR, L.J. Trans Fatty acids: infant and fetal development. *Am J Clin Nutr.* 1997; 66(3):717S-36S.

CARVER, J.D. Advances in nutritional modifications of infant formulas. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(suppl):1550S–4S.

CHRISTIE, W. W. *Gas chromatography and lipids: a practical guide.* Oily, Great Britain, 1989.

CHRISTIE, W. W. Fatty acids: methylene-interrupted double bonds - structures, occurrence and biochemistry. In: *The Lipid Library.* Disponível em: <http://lipidlibrary.aocs.org/>. Acessado em dezembro de 2010.

COSTA, C. E.; GOTLIEB, S. L. D. Estudo epidemiológico do peso ao nascer a partir da Declaração de Nascido Vivo *Rev. Saúde Pública* vol. 32 n. 4 São Paulo Aug. 1998.

COSTA, M.R; JIMÉNEZ-FLORES, R.; GIGANTE, M.L. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. *Alim. Nutr., Araraquara* v.20, n.3, p. 507-514, jul./set. 2009.

COSTA, A.G.V & SABARENSE, C.M. Modulação e composição de ácidos graxos do leite humano. *Revista de Nutrição*, 23(3):445-457, 2010.

CUNHA, J.; COSTA, T.H.M.; ITO, M.K. Influences of maternal dietary intake and suckling on breast milk lipid and fatty acid composition in low-income women from Brasília, Brazil. *Early Hum Dev.* 2005; 81(3):303-11.

DA SILVA, D.R.B.; JÚNIOR, P.F.M.; SOARES, E.A. A importância dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa na gestação e lactação. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife*, 7 (2): 123-133, abr. / jun., 2007.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. *Microscopia eletrônica de varredura. Aplicações e preparações de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores – Porto Alegre.* EDIPUCRS, 2007. 60,p.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. *Cromatografia: um breve ensaio. Química Nova na Escola, Cromatografia*, v. 7, p.21-25, 1998.

Esquema básico do funcionamento do MEV - <http://fap.if.usp.br/~lff/mev.html> - Acessado em 04/05/2016.

EUCLYDES, M.P. *Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação adequada.* Viçosa: UFV; 2000.

FERREIRA, C. E. C. Mortalidade infantil e desigualdade social em São Paulo, São Paulo. 1990. [Tese de Doutorado-Faculdade de Saúde Pública da USP].

FERREIRA, C. Caracterização por GC - MS de glícidos - Derivatização assistida por micro-ondas - Universidade de Coimbra. Dissertação, 2011.

FOMON, S.J. Nutrition of Normal Infants. St. Louis: Mosby-Year Book. 1993; p.129-131.

FOMON, J.S. Infant feeding in the 20th century: formula an beikost. J Nutr. 2001;131:S409-20.

GALLIER, S.; VOCKINGB, K.; POSTB, J.A.; HEIJNINGA, B.V.; ACTONA, D.; BEEKC, E.M.V.D.; BAALEN, T.V. A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fatglobule structure. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 136 (2015) 329–339.

GARCIA, C; INNIS, S. Structure of the human milk fat globule. Lipid Technology. October 2013, Vol. 25, No. 10 223-226.

GARCIA, C.; ANTONA, C.; ROBERT, B.; LOPEZ, C.; ARMAND, M. The size and interfacial composition of milk fat globules are key factors controlling triglycerides bioavailability in simulated human gastro-duodenal digestion. Food Hydrocolloids 35:494–504. 2014.

GARTON, G. A. The composition and biosynthesis of milk lipids. J. Lipid Research, v. 4, n 3, p. 237-254, 1963.

GIOVANNINI, M.; AGOSTONI, C.; SALARI, P.C. The role of lipids in nutrition during the first months of life. J Inter Med Res. 1991; 19(5):351-62. doi:10.1038/sj.ejcn.1601810.

GIUGLIANI, E.R.J.; VICTORA, C.G. Normas alimentares para crianças brasileiras menores de 2 anos. Bases Científicas. Brasília: OPAS/OMS; 1997. 62p.

HALL, B. Uniformity of human milk. Am. J. Clin. Nutr., v. 32, n 2, p. 304-312, 1979.

HAYAT, L.; AI-SUGHAYER, M.A.; Afzal M. Fatty acid composition of human milk in Kuwaiti mothers. Comp Biochem Physiol. 1999; 124(3):261-7.

HYLANDER, M. A.; STROBINO, D. M.; DHANIREDDY, R. Human milk feedings and retinopathy of prematurity among very low birth weight infants. Pediatr Res 1996; 37:214 A.

INFANT NUTRITION AND FEEDING - United States Department of Agriculture – Food and Nutrition Service – Special Supplemental Nutrition Program for Women Infants, and Children (WIC) – 2009 – Chapter 04 – Infant Formula and Feeding – 81-96.

JENSEN, R.G.; BITMAN, J.; CARLSON, S.E.; COUCH, S.C.; HAMOSH, M.; NEWBURG, D.S. Milk lipids. A. Human Milk lipids. In: Handbook of milk composition. San Diego: Academic Press; 1995.

JENSEN, R. G. Lipids in human milk. Lipids, v. 34, n 12, p. 1243-1271, 1999.

JENSEN, R.G; FERRIS, A.M; LAMMI-KEEFE, C.J. Lipids of bovine and human milks: a comparison. J Dairy Sci 1990; 73:223-40.

KALAB, M. Foods under the microscope. Update: 16/03/2000. Disponível em:<<http://anka.livstek.lth.se:2080/microscopy> > Acesso em: 15/09/2015.

KOLETZKO, B.; RODRIGUEZ-PALMERO, M.; DEMMELMAIR, H.; FIDLER, N.; JENSEN, R.; SAUERWALD, T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development*, v. 65, Suppl 2, p. S3-S18, 2001.

KOLETZKO, B.; SAUERWALD, U.; KEICHER, U.; SAULE, H.; WAWATSCHEK, S.; BÖHLES, H. Fatty acid profiles, antioxidant status, and growth of preterm infants fed diets without or with long-chain polyunsaturated fatty acids. *Eur J Clin Nutr.* 2003; 42(5):243-53.

KOLETZKO, B.; BAKER, S.; CLEGHORN, G; NETO, U.F.; GOPALAN, S.; HERNELL, O.; HOCK, Q.S.; JIRAPINYO, P.; LONNERDAL, B; PENCHARZ, P.; PZYREMBEL, H.; RAMIREZMAYANS, J.; SHAMIR, R.; TURCK, D.; YAMASHIRO, Y.; ZONGYI, D. Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 2005; 41:584-599.

KUS, M.M.M.; MANCINI-FILHO, J. *Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes - Ácidos Graxos. ILSI Brasil International Life Science Institute do BraSIL, V.17, P.20, 2010.*

KUS, M.M.M.; SILVA, S.A.; AUED-PIMENTEL, S.; MANCINI-FILHO, J. Informação nutricional de fórmulas infantis comercializadas no Estado de São Paulo: Avaliação dos teores de lipídeos e ácidos graxos. *Rev. Nutr., Campinas*, 24(2):209-218, mar./abr., 2011.

LAMOUNIER, J.A.; VIEIRA, G.O.; GOUVÊA, L.C. Composição do leite humano - Fatores nutricionais. In: Rego JD. *Aleitamento Materno*. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 47-58.

LAURITZEN, L.; HANSEN, H.S.; JØRGENSEN, M.H.; MICHAELSEN, K.F. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res.* 2001 Jan-Mar;40(1-2):1-94.

LIRA, B. F. Qualidade da fração lipídica do leite humano ordenhado e processado. 2002. 69f. Recife. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Recife, Recife, 2002.

LONG, A.C.; KAISER, J.L.; KATZ, G.E. Lipids in infant formulas: Current and future Innovations. *Lipid Technology* June 2013, Vol. 25, No. 6.

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; CASTELLOTE-BARGALLÓ, A.I.; CAMPOYFOLGOSO, C.; RIVERO-URGEL, M.; TORMO-CARNICÉ, R. Infante-Pina D, et al. The influence of dietary palmitic acid triacylglyceride position on the fatty acid, calcium and magnesium contents of at term newborn faeces. *Early Hum Dev.* 2001; 65(Suppl 2):83S-94S.

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; LÓPEZ-SABATER, M.C.; CAMPOY-FOLGOSO, C.; RIVERO-URGELL, M.; CASTELLOTE-BARGALLO, A.I. Fatty acid and sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada (Spain) and in infant formulas. *European Journal of Clinical Nutrition* (2002) 56, 1242–1254.

LOPEZ, C.; MENARD, O. Human milk fat globules: Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 83 (2011) 29–41.

MANDEL, D.; LUBETZKY, R.; DOLLBERG, S.; BARAK, S.; MIMOUNI, F.B. Fat and energy contents of expressed human breast milk in prolonged lactation. *Pediatrics*. 2005; 116(3):432-5. doi:10.1542/peds. 2005-0313.

MARQUES, R. F. S. V.; LOPEZ, F. A.; BRAGA, J. A. P. O crescimento de crianças alimentadas com leite materno exclusivo nos primeiros 6 meses de vida. *Rev. chil. pediatr.* 2006, vol.77, n.5, pp. 529-530. ISSN 0370-4106.

MARTINS, F.J. Evolução do aleitamento materno no Brasil. In: Rego JD. Aleitamento Materno. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 21-34.

McMANAMAN, J. L. & NEVILLE, M. C. Mammary physiology and milk secretion. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 55 n 5, p. 615-697, 2003.

NAGATANI, T.; SAITO, S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. *Scanning Microscopy*. v.11, 901-909, 1987.

OLEYNIK, A.; ELISEEVA, T.; VANDERHOEK, J.Y. Comparative Lipid Profiles of Milk Bank Breast Milk and Infant Formulas. *The Open Nutrition Journal*, 2013, 7, 26-31.

PEÇANHA, R.P. Sistemas particulados: operações unitárias envolvendo partículas e fluidos. Editora Elsevier: Rio de Janeiro, 2014. 424p.

PEREIRA, A. S., AQUINO NETO, F. R. Estado da Arte da Cromatografia Gasosa de Alta Resolução e Alta Temperatura. *Química Nova*, v. 23(3), p. 370-379, 2000.

RADBILL, S. Infant feeding through the ages. *Clinical Pediatrics*. 1981; 20(10):613–621.

REA, M.F. Breast-milk substitutes: past and present. *Rev Saude Publica*. 1990;24(3):241.

RÊGO, C.; TELES, A.; NAZARETH, M.; GUERRA, A. Leites e Fórmulas Infantis: a realidade portuguesa revisitada em 2012. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 2013;44(5):S50-S93

RIVA, E.; VERDUCI, E.; AGOSTONI, C. Nutritional values of follow-on formulae in Italy. *The journal of international medical research*, 35:20-37, 2007.

SANTOS, R.D.; GAGLIARDI, A.C.M.; XAVIER, H.T.; MAGNONI, C.D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A.M. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. *Arq Bras Cardiologia*. 2013;100 (1Supl.3):1-40

SARKAR, S. Nutritional aspects of breast milk. *Nutrition & Food Science*, v. 34, n 4, p.151-155, 2004.

SCHNEIDER, J.M; FUJII, M.L; LAMP, C.L; LÖNNERDAL, B; DEWEY, K.G; ZIDENBERG-CHERR, S. Anemia, iron deficiency, and iron deficiency anemia in 12–36-mo-old children from low-income families. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(6):1269-75.

SCOTT, R. P. W. Principles and practice of chromatography. LibraryForScience, Chrom-Ed Book Series. Book 1. 2003.

SHERRY, B; MEY, Z; YIP, R. Continuation of the decline in prevalence of anemia in low-income infants and children in five states. *Pediatrics*. 2001; 107 (4):677-82.

SILVA, M.H.L.; SILVA, M.T.C.; BRANDÃO, S.C.C.; GOMES, J.C.; PETERNELLI, L.A.; FRANCESCHINI, S.C.C. Fatty acid composition of mature breast milk in Brazilian women. *Food Chem*. 2005; 93(2):297-303.

SILVA, R. C.; ESCOBEDO, J. P.; GIOIELLI, L. A.; QUINTAL, V. S; IBIDI, S. M; ALBUQUERQUE, E. M. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. *Quím. Nova* vol.30 no.7 São Paulo 2007 (a).

SILVA, D.R.B.; MIRANDA-JÚNIOR, P.F.; SOARES, E.A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. *Rev Bras Saúde Mater Infan*. 2007; 7(2):123-33 (b).

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. Spectrometric Identification of Organic Compounds. Both of State Univ. of New York, College of Environmental Science & Forestry. Wiley, 1998 – Science – 482p.

SIMOPOULOS, AP. The importance of ratio of omega- 6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 2002; 56(8):365-79. doi: 10.1159/ 000073788.

SINCLAIR, R. Good, bad or essential fats: what is the story with Omega-3? *Nutrition & Food Science*, v. 30, n 4, p.178-182, 2000.

STANNER, S. n-3 fatty acids and health. Conference Report. British Nutrition Foundation. *Nutrition Bulletin*, v. 25, n 1, p. 81-84, mar., 2000.

STRAARUP, E.M; LAURITZEN, L; FAERK, J; Carl-Erik, H; MICHAELSEN, K.F.

The Stereospecific Triacylglycerol Structures and Fatty Acid Profiles of Human Milk and Infant Formulas. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 42:293-299 - March 2006 - Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

THOMPSON, D.K; KHARB, S. Aspects of Infant Food Formulation. *Comprehensive. Reviews in Food Science and Food Safety*, 2007. V. 6, p79-102.

TINOCO, S.M.B.; SICHIERI, R.; MOURA, A.S.; SANTOS, F.S.; CARMO, M.G.T. Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos trans do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 23(3):525-534, mar, 2007.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.2, p. 440-450, 2009.

TURK, D. Formula feeding. In *Pediatric Nutrition in Practice*. ed. B. Koletzko. Baser, Karger, 2008, pp 90-7

UAUY, R. Are fatty acids required for normal eye and brain development in the human? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v. 11, n 3, p.296-302, 1990.

VILLALPANDO, S., PRADO-MANRIQUEZ, M.D., STAFFORD, J., DELGADO, G. Diurnal variations in the fatty acid composition of milk fat from marginally nourished women. *Archives of Medical Research*, v.26, p.S139-S143, 1995.

von SCHACKY, C. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v. 7, n 2, p.131-136, 2004.

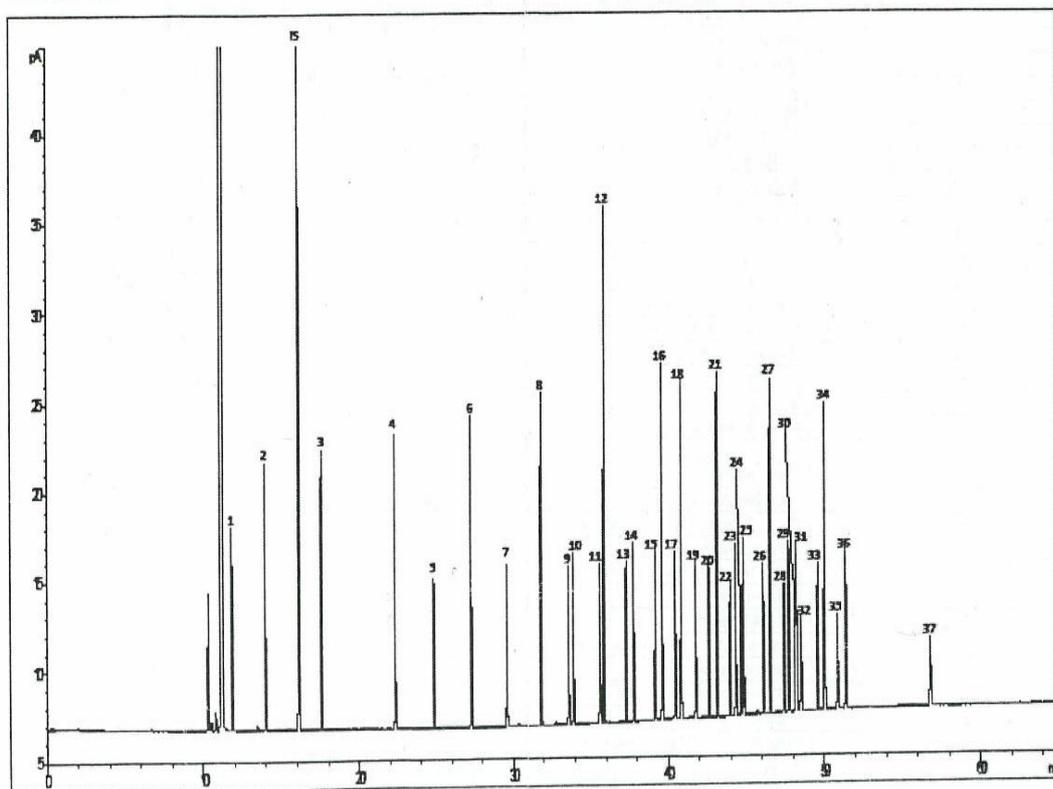
YAMAWAKI, N.; YAMADA, M.; KAN-no, T.; KOJIMA, T.; KANEKO, T.; YONEKUBO, A. Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *J Trace Elem Med Biol*. 2005; 19 (2-3):171-81..doi:10.1016/j.jtemb.2005.05.001.

ZAMBIAZI, R.C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M.W.; MENDONÇA, C.B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. *B.CEPPA, Curitiba*, v. 25, n. 1, p. 111-120, jan./jun. 2007.

ZUNIN, P.; BOGGIA, R.; TURRINI, F.; LEARDI, R. Total and free lipids in commercial infant formulas: Fatty acid composition and their stability to oxidation. *Food Chemistry*. 2015; 173 (332–338).

ANEXO

Anexo A1 - Cromatograma oficial do padrão de ácidos graxos Supelco 37 - Fame Mix

SUPELCO
Solutions within.™595 North Harrison Road - Bellefonte, PA
16823-0048 USA - Phone (814) 359-3441**Supelco 37-Component FAME Mix in Dichloromethane**Part Number: CRM47885
Storage: FreezeFor Analytical Method Parameters and Component List
See next page

Anexo A2 – Legenda oficial do padrão de ácidos graxos Supelco37 – Fame Mix

**Analytical Conditions and
Components of CRM47885, FAME Mix, C4-C24**

Peak Identifier	Component Name	Column:	SP™-2560, 100 m x 0.25 mm, 0.2 µm (24056)
1	Methyl butyrate	Detector Type and Temperature:	FID at 260 °C
2	Methyl hexanoate	Inlet Temperature:	250 °C
IS	Pentadecane (Internal Standard)	Carrier Gas and Flow Rate:	Helium at 20 cm/s
3	Methyl octanoate	Make-Up Gas and Flow Rate:	Nitrogen at 30 mL/min
4	Methyl decanoate	Split Ratio:	100:1
5	Methyl undecanoate	Liner Type:	Fast Focus
6	Methyl laurate	Direct Injection?	No
7	Methyl tridecanoate	Column Temperature Profile:	Hold at 100 °C for five minutes. Ramp to 240 °C at 4 °C/min. Hold at 240 °C for 30 min.
8	Methyl myristate	Sample Volume Injected:	1.00 µL
9	Myristoleic acid methyl ester	Sample Concentration and Solvent:	10 mg/mL in methylene chloride
10	Methyl pentadecanoate	Internal Standard Concentration and Solvent:	1000 µg/mL in methylene chloride
11	Cis-10-pentadecanoic acid methyl ester	Sample Prep:	500 µL sample + 500 µL pentadecane internal standard
12	Methyl palmitate	SP is a trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC.	
13	Methyl palmitoleate		
14	Methyl heptadecanoate		
15	Cis-10-heptadecanoic acid methyl ester		
16	Methyl stearate		
17	Trans-9-elaidic acid methyl ester		
18	Cis-9-oleic acid methyl ester		
19	Linoleic acid methyl ester		
20	Methyl linoleate		
21	Methyl arachidate		
22	Gamma-linolenic acid methyl ester		
23	Methyl eicosanoate		
24	Methyl linolenate		
25	Methyl heneicosanoate		
26	Cis-11,14-eicosadienoic acid methyl ester		
27	Methyl behenate		
28	Cis-8,11,14-eicosatrienoic acid methyl ester		
29	Methyl erucate		
30	Cis-11,14,17-eicotrienoic acid methyl ester		
31	Methyl cis-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid methyl ester		
32	Methyl tricosanoate		
33	Cis-13,16-docosadienoic acid methyl ester		
34	Methyl lignocerate		
35	Methyl cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoate		
36	Methyl nervonate		
37	Cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid methyl ester		



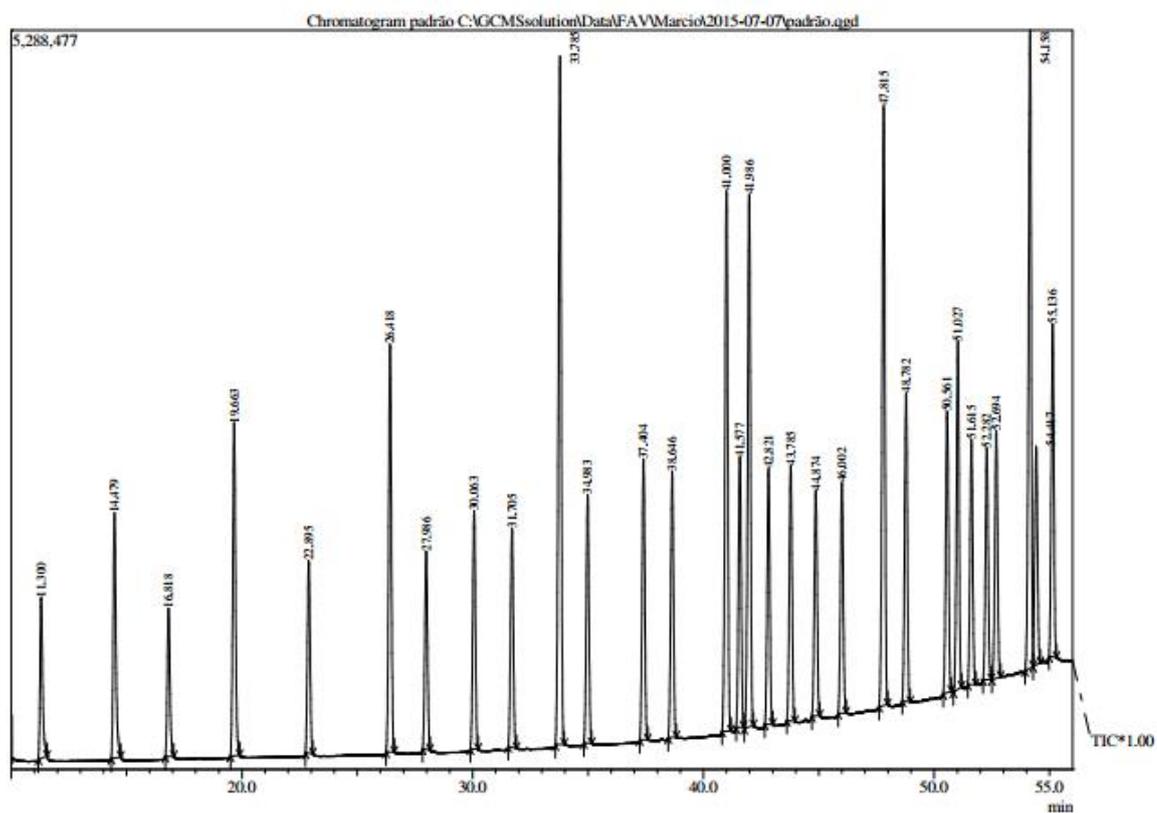
Cert# AT-1607



Cert# AR 1605

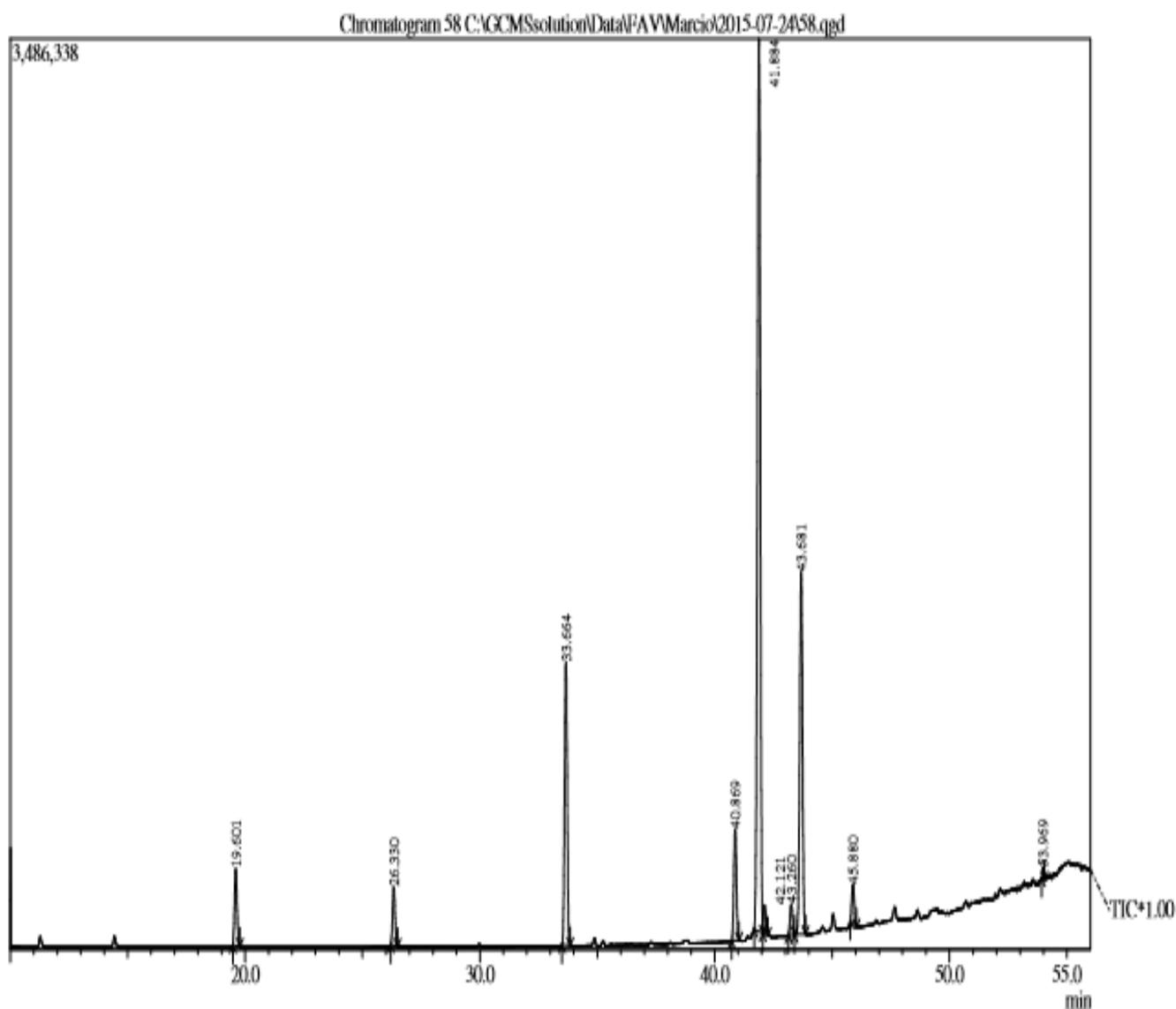
Produced in double accredited
laboratory fulfilling
ISO/IEC 17025 and
ISO Guide 34

Anexo A3 - Cromatograma do Padrão Fame Mix Supelco 37, injetado no cromatógrafo gasoso CG-2010 Shimadzu com detector MS-QP2010 Plus



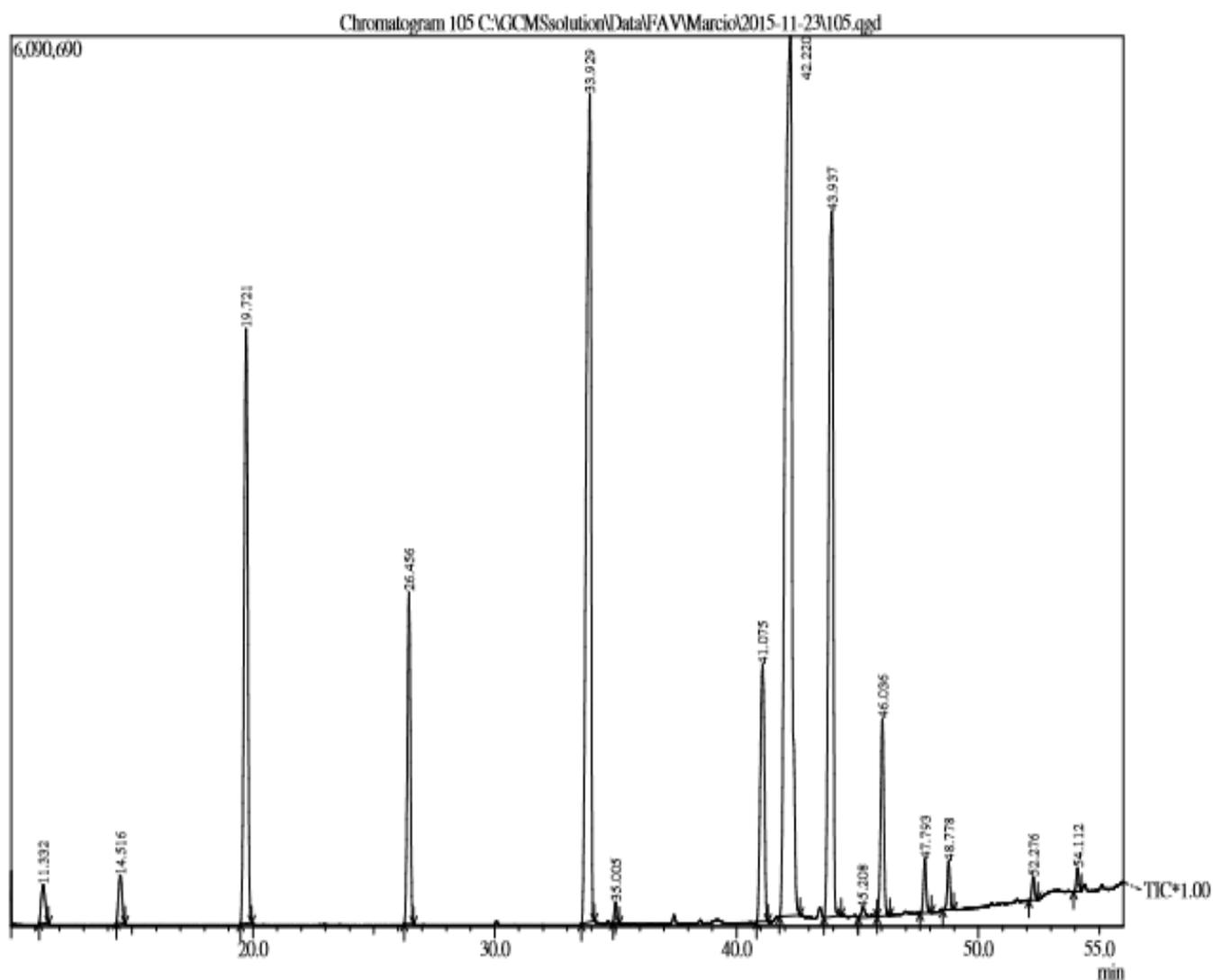
Peak#	R.Time	L.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	11.300	11.175	11.558	8856123	1.61	1152737	1.72	7.68		
2	14.479	14.333	14.750	14356655	2.60	1752595	2.61	8.19		
3	16.818	16.683	17.050	8496403	1.54	1061711	1.58	8.00		
4	19.663	19.500	19.900	19681525	3.57	2384240	3.55	8.25		
5	22.895	22.750	23.075	10976723	1.99	1377540	2.05	7.97		
6	26.418	26.242	26.608	23839476	4.32	2917713	4.34	8.17		
7	27.986	27.833	28.158	11594430	2.10	1418890	2.11	8.17		
8	30.063	29.900	30.233	13655593	2.48	1704402	2.54	8.01		
9	31.705	31.542	31.892	12902913	2.34	1568328	2.33	8.23		
10	33.785	33.583	33.975	41624896	7.55	4925761	7.33	8.45		
11	34.983	34.817	35.158	14381200	2.61	1778582	2.65	8.09		
12	37.404	37.233	37.583	16073284	2.91	2006904	2.99	8.01		
13	38.646	38.475	38.825	15542194	2.82	1904881	2.84	8.16		
14	41.000	40.808	41.192	32936667	5.97	3866713	5.76	8.52		
15	41.577	41.417	41.750	15850131	2.87	1933616	2.88	8.20		
16	41.986	41.775	42.167	31680159	5.74	3808647	5.67	8.32		
17	42.821	42.658	43.000	14723319	2.67	1828870	2.72	8.05		
18	43.785	43.617	43.967	14947065	2.71	1828247	2.72	8.18		
19	44.874	44.700	45.042	13596508	2.47	1614637	2.40	8.42		
20	46.002	45.833	46.183	13727181	2.49	1648877	2.45	8.33		
21	47.815	47.608	47.983	36028142	6.53	4289967	6.39	8.40		
22	48.782	48.617	48.958	17823252	3.23	2204980	3.28	8.08		
23	50.561	50.392	50.742	16302464	2.96	2012711	3.00	8.10		
24	51.027	50.833	51.192	19549046	3.54	2493650	3.71	7.84		
25	51.615	51.450	51.800	14049239	2.55	1755894	2.61	8.00		
26	52.282	52.117	52.475	13692334	2.48	1660467	2.47	8.25		
27	52.694	52.500	52.883	14601610	2.65	1772393	2.64	8.24		
28	54.158	53.942	54.283	38155443	6.92	4562891	6.79	8.36		
29	54.417	54.283	54.600	13241253	2.40	1563758	2.33	8.47	V	
30	55.136	54.975	55.300	18678573	3.39	2383857	3.55	7.84		
				551563801	100.00	67184459	100.00			

Anexo A4– Cromatograma de uma amostra de F.I para lactentes FIR



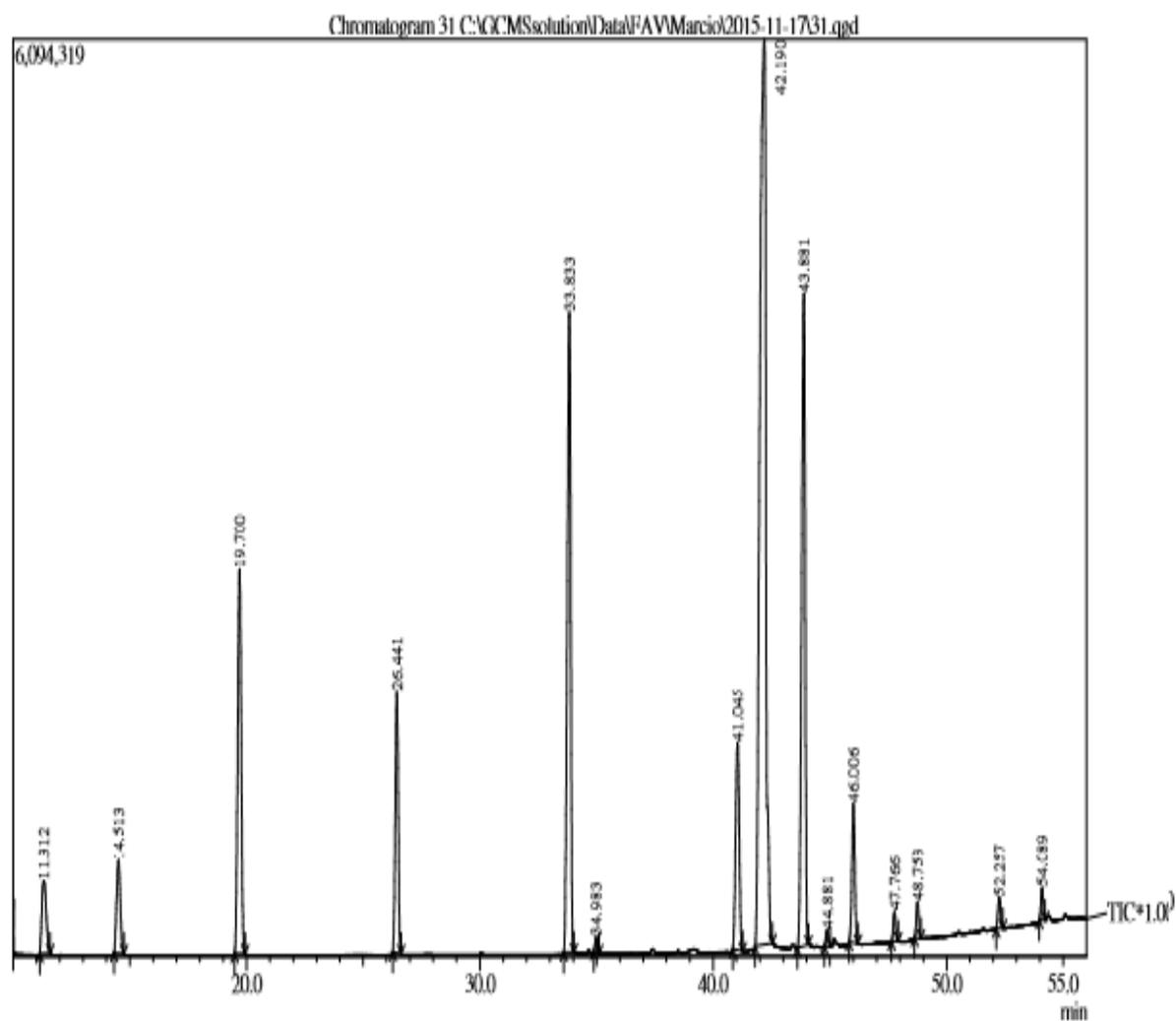
Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark Name
1	19.601	19.475	19.783	2215311	3.74	294543	4.07	7.52	
2	26.330	26.208	26.492	1635066	2.76	223981	3.09	7.30	
3	33.664	33.500	33.850	8475561	14.32	1081994	14.94	7.83	
4	40.869	40.725	41.033	3228194	5.45	425218	5.87	7.59	
5	41.884	41.683	42.050	29077072	49.13	3416865	47.17	8.51	
6	42.121	42.050	42.258	762433	1.29	110206	1.52	6.92	V
7	43.260	43.142	43.392	879282	1.49	116882	1.61	7.52	
8	43.681	43.392	43.867	11564335	19.54	1386301	19.14	8.34	V
9	45.880	45.775	46.033	1137555	1.92	145705	2.01	7.81	
10	53.969	53.925	54.042	206140	0.35	42210	0.58	4.88	
				59180949	100.00	7243905	100.00		

Anexo A5– Cromatograma de uma amostra de F.I para lactentes FIP



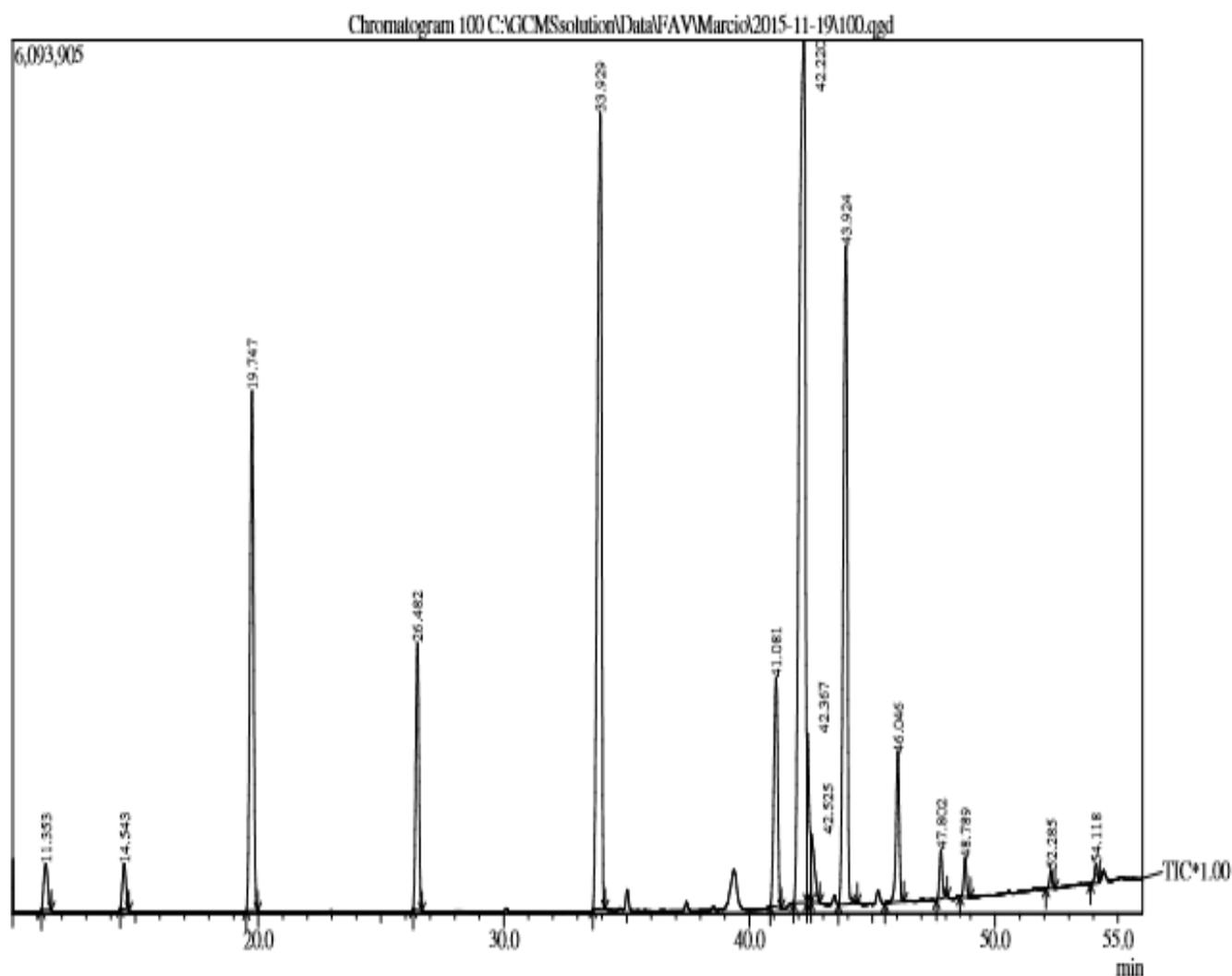
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	11.332	11.167	11.558	3037581	0.82	259237	0.93	11.72		
2	14.516	14.358	14.708	3306114	0.89	325204	1.17	10.17		
3	19.721	19.483	19.950	42831313	11.50	4068643	14.67	10.53		
4	26.456	26.258	26.642	20412130	5.48	2271544	8.19	8.99		
5	33.929	33.592	34.117	76368805	20.51	5667427	20.43	13.48		
6	35.005	34.892	35.142	994869	0.27	142314	0.51	6.99		
7	41.075	40.833	41.300	20656377	5.55	1759128	6.34	11.74		
8	42.220	41.775	42.625	120401398	32.34	6016776	21.69	20.01		
9	43.937	43.608	44.333	63103870	16.95	4826707	17.40	13.07		
10	45.208	45.033	45.808	875599	0.24	62484	0.23	14.01		
11	46.086	45.808	46.333	12279344	3.30	1339310	4.83	9.17	V	
12	47.793	47.583	48.058	2967293	0.80	361297	1.30	8.21		
13	48.778	48.533	48.983	2640808	0.71	328477	1.18	8.04		
14	52.276	52.083	52.458	1250729	0.34	156686	0.56	7.98		
15	54.112	53.933	54.258	1182714	0.32	156657	0.56	7.55		
				372308944	100.00	27741891	100.00			

Anexo A6– Cromatograma de uma amostra de F.I para lactentes FIPRNBP



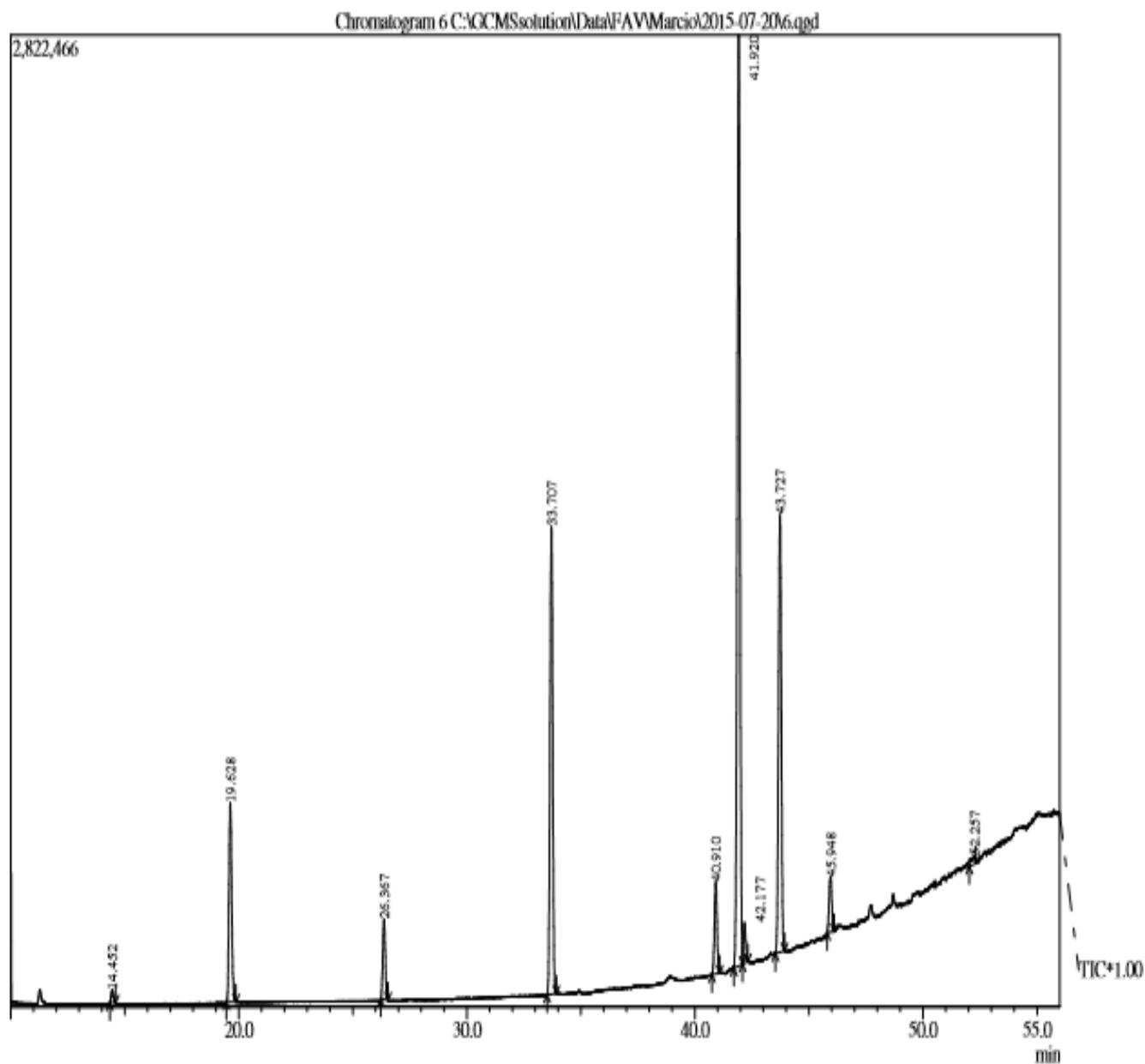
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	L.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	11.312	11.133	11.592	6206508	2.19	476157	2.04	13.03		
2	14.513	14.325	14.750	6807961	2.40	610851	2.61	11.15		
3	19.700	19.483	19.933	26180451	9.23	2555845	10.94	10.24		
4	26.441	26.267	26.625	15441465	5.45	1744428	7.47	8.85		
5	33.833	33.592	34.025	42954207	15.15	4266985	18.26	10.07		
6	34.983	34.892	35.108	664775	0.23	99035	0.42	6.71		
7	41.045	40.842	41.267	14665614	5.17	1375485	5.89	10.66		
8	42.190	41.792	42.542	109597206	38.65	6015064	25.75	18.22		
9	43.881	43.608	44.083	45921194	16.19	4345672	18.60	10.57		
10	44.881	44.767	45.017	769706	0.27	101948	0.44	7.55		
11	46.006	45.817	46.200	8017266	2.83	930267	3.98	8.62		
12	47.766	47.633	47.925	1464932	0.52	193366	0.83	7.58		
13	48.753	48.625	48.900	1748487	0.62	235047	1.01	7.44		
14	52.257	52.125	52.417	1655506	0.58	202793	0.87	8.16		
15	54.089	53.975	54.225	1464216	0.52	210149	0.90	6.97		
				283559494	100.00	23363092	100.00			

Anexo A7 – Cromatograma de uma amostra de F.I para lactentes FIEAPG



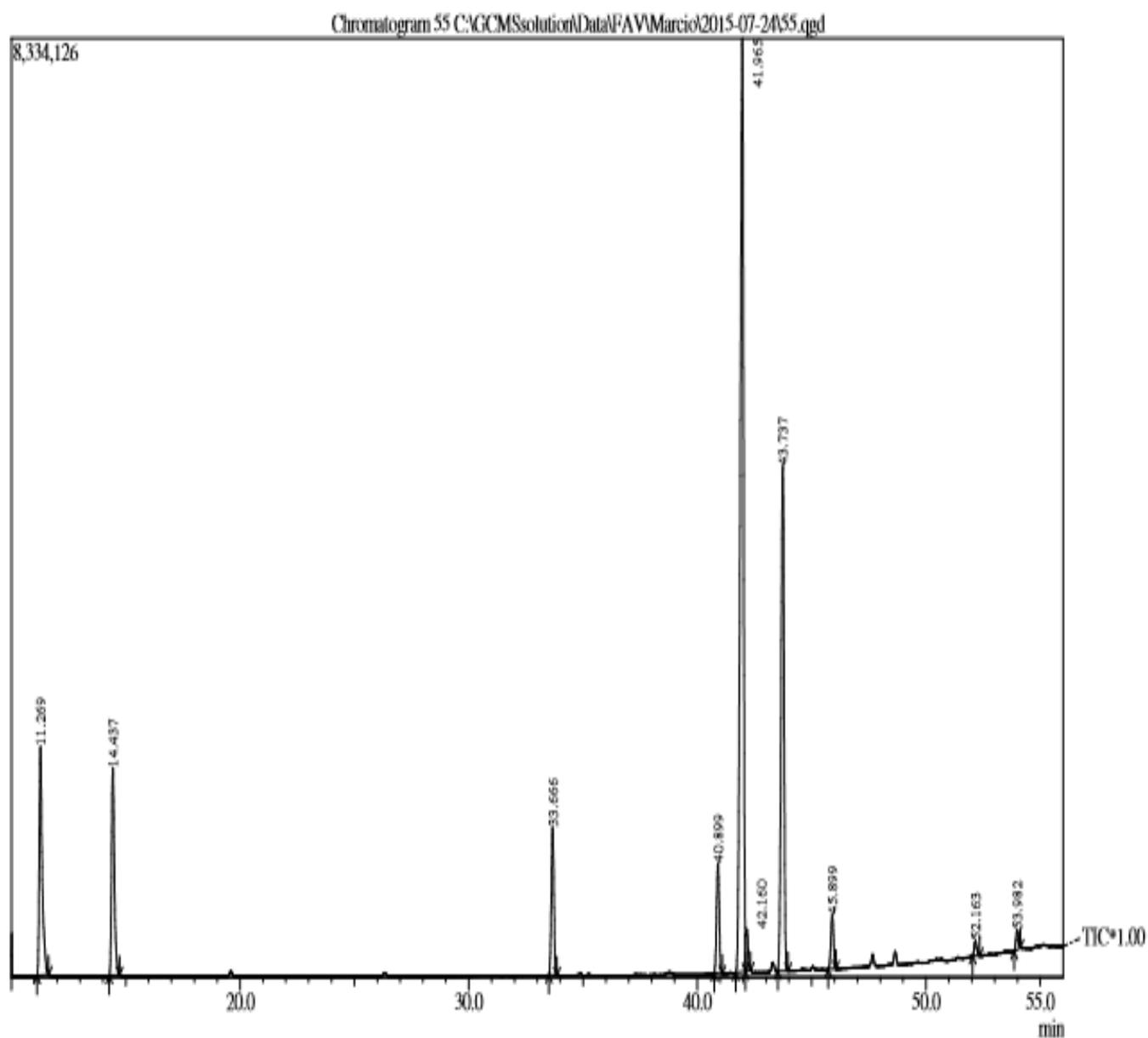
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	L.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	11.353	11.183	11.583	3790465	1.14	319588	1.16	11.86		
2	14.543	14.392	14.733	3139752	0.94	316017	1.15	9.94		
3	19.747	19.517	19.975	37016564	11.12	3629580	13.23	10.20		
4	26.482	26.300	26.667	16688516	5.01	1867672	6.81	8.94		
5	33.929	33.625	34.125	68623666	20.61	5556768	20.25	12.35		
6	41.081	40.842	41.300	17542163	5.27	1596769	5.82	10.99		
7	42.220	41.800	42.342	105230728	31.60	6017124	21.93	17.49		
8	42.367	42.342	42.500	7576813	2.28	1180218	4.30	6.42	V	
9	42.525	42.500	42.867	4527174	1.36	469537	1.71	9.64	V	
10	43.924	43.617	44.392	52036184	15.63	4592325	16.74	11.33		
11	46.046	45.517	46.292	9855870	2.96	1036528	3.78	9.51		
12	47.802	47.617	48.042	2641720	0.79	326242	1.19	8.10		
13	48.789	48.567	48.992	2154042	0.65	270636	0.99	7.96		
14	52.285	52.067	52.442	999058	0.30	125829	0.46	7.94		
15	54.118	53.892	54.267	1138116	0.34	130616	0.48	8.71		
				332960831	100.00	27435449	100.00			

Anexo A8 – Cromatograma de uma amostra de F.I para lactentes FIS



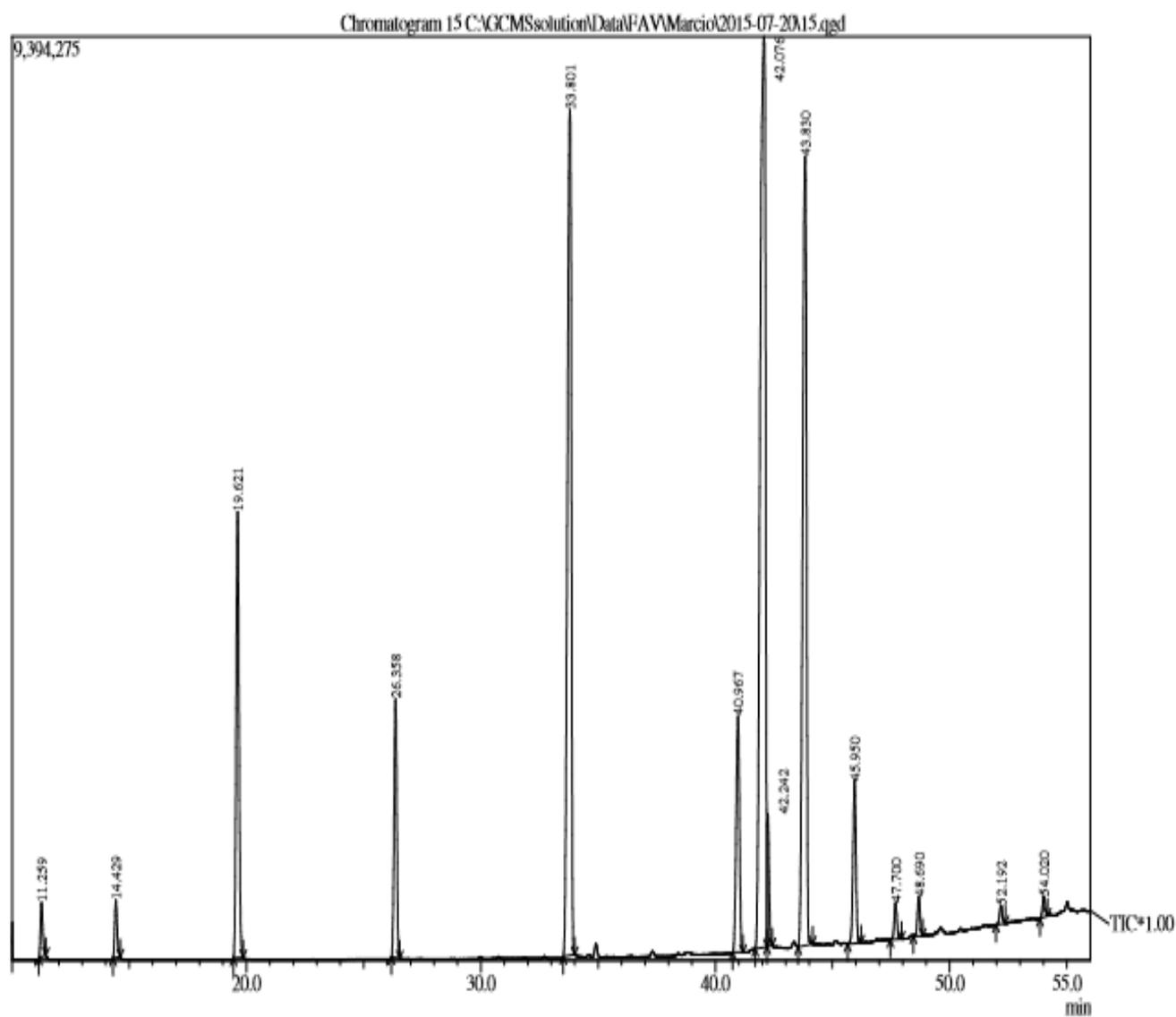
Peak Report TIC										
Peak#	RTime	LTime	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	14.452	14.350	14.600	253775	0.46	36213	0.54	7.01		
2	19.628	19.458	19.883	4664448	8.39	577131	8.56	8.08		
3	26.367	26.225	26.542	1752791	3.15	232916	3.46	7.53		
4	33.707	33.517	33.925	10796174	19.43	1357750	20.14	7.95		
5	40.910	40.750	41.083	2091508	3.76	265922	3.94	7.87		
6	41.920	41.717	42.092	22953182	41.30	2703196	40.10	8.49	V	
7	42.177	42.092	42.317	869218	1.56	117203	1.74	7.42	V	
8	43.727	43.525	43.925	10614251	19.10	1269741	18.84	8.36		
9	45.948	45.800	46.100	1316042	2.37	159001	2.36	8.28		
10	52.257	52.025	52.317	264809	0.48	21980	0.33	12.05	V	
				55576198	100.00	6741053	100.00			

Anexo A9 – Cromatograma de uma amostra de F.I para lactentes FIASPLVM



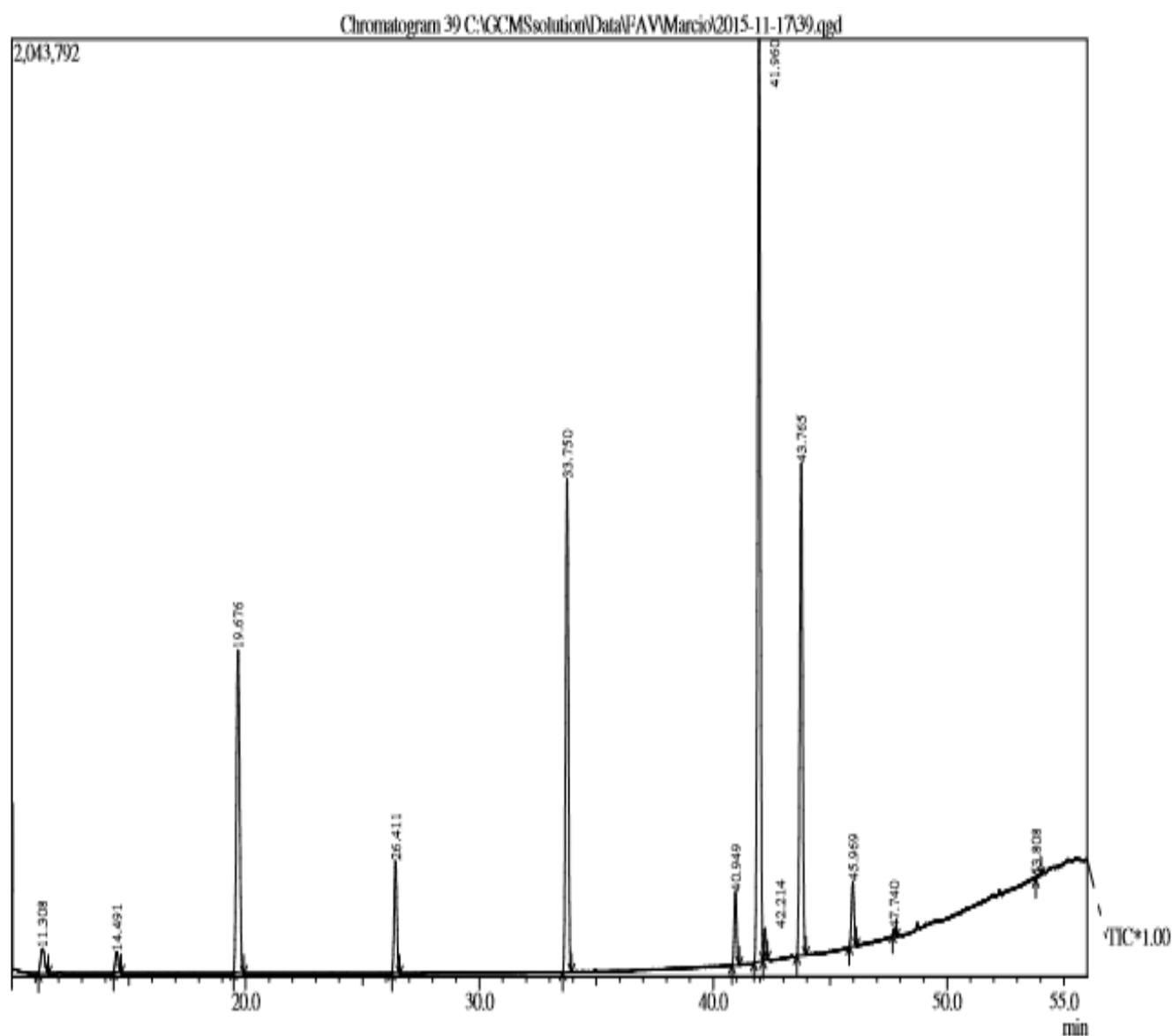
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	11.269	11.125	11.633	18250592	9.96	2031822	10.11	8.98		
2	14.437	14.283	14.733	15598532	8.52	1842644	9.17	8.47		
3	33.666	33.508	33.858	10185534	5.56	1311504	6.53	7.77		
4	40.899	40.733	41.092	7951598	4.34	980952	4.88	8.11		
5	41.965	41.683	42.108	82586369	45.09	8285778	41.24	9.97		
6	42.160	42.108	42.333	2458465	1.34	372736	1.86	6.60	V	
7	43.737	43.517	43.967	39780095	21.72	4481347	22.31	8.88	V	
8	45.899	45.725	46.067	3937803	2.15	482373	2.40	8.16		
9	52.163	52.033	52.350	1055192	0.58	129041	0.64	8.18		
10	53.982	53.850	54.125	1342769	0.73	172762	0.86	7.77		
				183146949	100.00	20090959	100.00			

Anexo A10 – Cromatograma de uma amostra de F.I para lactentes FIIL



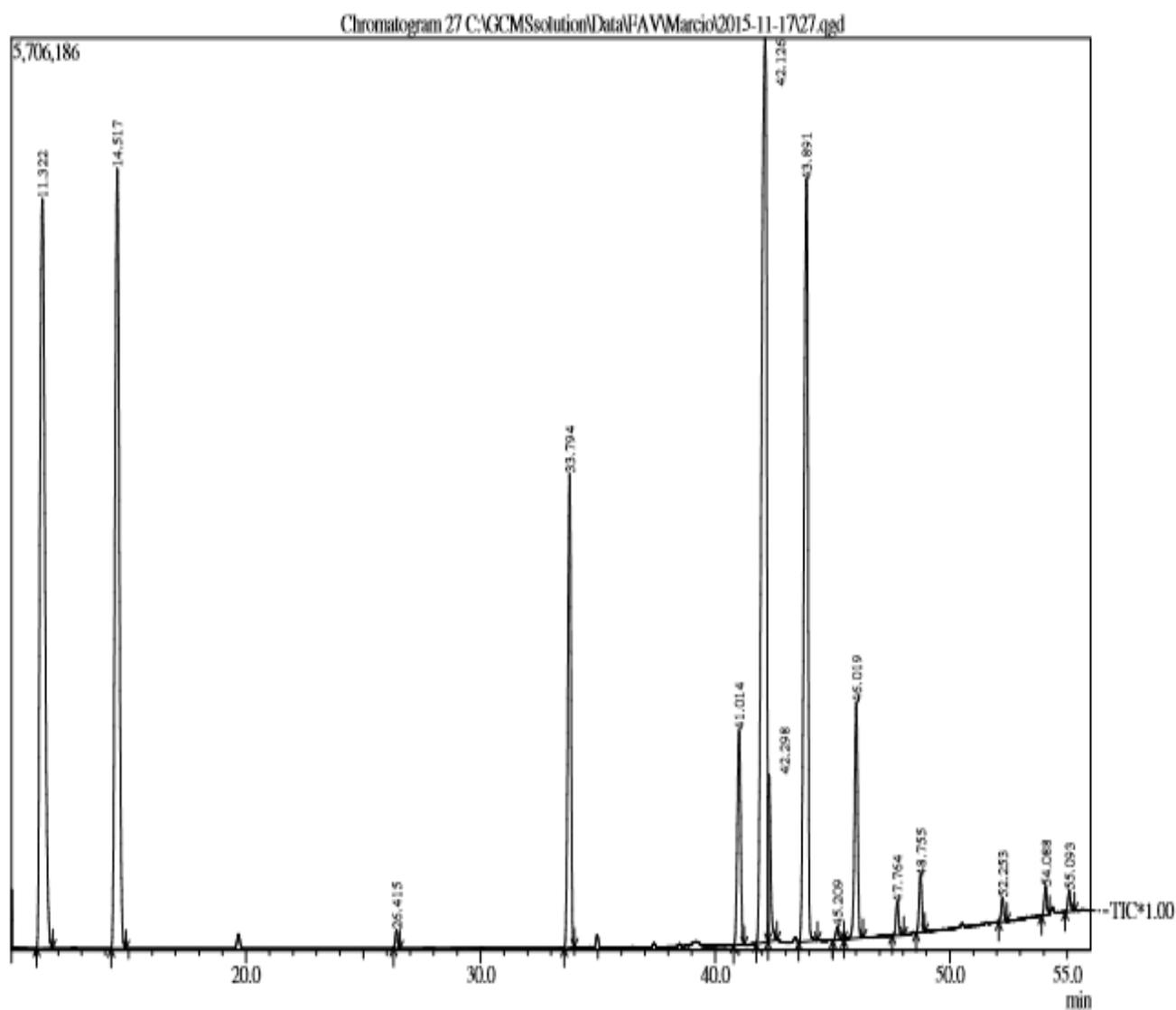
Peak Report TIC													
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name			
1	11.259	11.150	11.450	3902603	0.84	553030	1.36	7.06					
2	14.429	14.308	14.617	4303700	0.93	583702	1.43	7.37					
3	19.621	19.442	19.858	38332558	8.29	4534711	11.13	8.45					
4	26.358	26.192	26.542	21470454	4.64	2631046	6.46	8.16					
5	33.801	33.517	34.000	98851839	21.38	8599607	21.11	11.49					
6	40.967	40.742	41.183	23950653	5.18	2405585	5.91	9.96					
7	42.076	41.700	42.208	148513276	32.13	9258890	22.73	16.04					
8	42.242	42.208	42.425	7173973	1.55	1343700	3.30	5.34	V				
9	43.830	43.525	44.150	91851073	19.87	8023960	19.70	11.45					
10	45.950	45.650	46.225	14512422	3.14	1650228	4.05	8.79					
11	47.700	47.475	47.950	3009055	0.65	370729	0.91	8.12					
12	48.690	48.450	48.850	3129489	0.68	384685	0.94	8.14					
13	52.192	51.975	52.375	1576042	0.34	185431	0.46	8.50					
14	54.020	53.850	54.175	1683909	0.36	209503	0.51	8.04					
				462261046	100.00	40734807	100.00						

Anexo A11 – Cromatograma de uma amostra de F.I para lactentes FIPIS



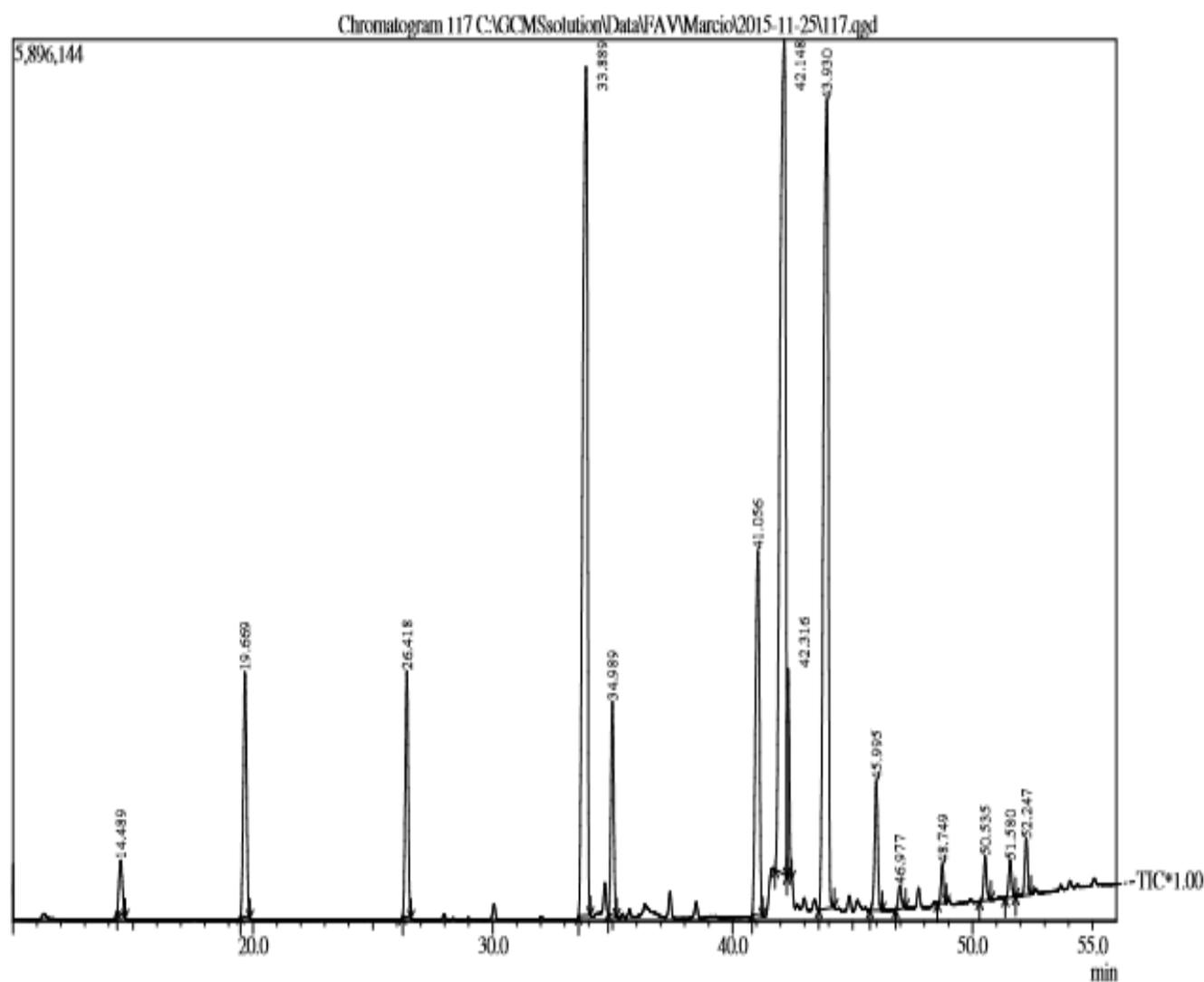
Peak Report TIC											
Peak#	RTime	LTime	FTime	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name	
1	11.308	11.142	11.567	658424	1.37	53442	0.96	12.32			
2	14.491	14.350	14.675	433092	0.90	43949	0.79	9.85			
3	19.676	19.483	19.925	6740443	14.04	703198	12.58	9.59			
4	26.411	26.258	26.592	1935142	4.03	243106	4.35	7.96			
5	33.750	33.558	33.942	8703486	18.13	1074916	19.23	8.10			
6	40.949	40.800	41.108	1181552	2.46	159626	2.86	7.40			
7	41.960	41.750	42.133	17595817	36.65	2009985	35.96	8.75			
8	42.214	42.133	42.317	453854	0.95	68085	1.22	6.67	V		
9	43.765	43.575	43.958	9080021	18.91	1073018	19.20	8.46			
10	45.969	45.825	46.125	1085765	2.26	141744	2.54	7.66			
11	47.740	47.675	47.833	68610	0.14	13454	0.24	5.10			
12	53.808	53.792	54.033	71574	0.15	5009	0.09	14.29			
				48007780	100.00	5589532	100.00				

Anexo A12– Cromatograma de uma amostra de F.I para lactentes FIPEH



Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	11.322	11.075	11.758	68406100	19.94	4691331	16.76	14.58		
2	14.517	14.250	14.883	62159867	18.12	4882946	17.44	12.73		
3	26.415	26.283	26.567	865348	0.25	115233	0.41	7.51		
4	33.794	33.558	34.000	27181977	7.92	2964431	10.59	9.17		
5	41.014	40.792	41.242	13247667	3.86	1342481	4.80	9.87		
6	42.126	41.742	42.250	85726343	24.99	5654944	20.20	15.16		
7	42.298	42.250	42.633	7416991	2.16	1041884	3.72	7.12	V	
8	43.891	43.558	44.358	55287768	16.12	4766695	17.03	11.60		
9	45.209	45.008	45.483	740142	0.22	80350	0.29	9.21		
10	46.019	45.483	46.308	13756213	4.01	1436920	5.13	9.57		
11	47.764	47.533	48.033	1723209	0.50	207515	0.74	8.30		
12	48.755	48.558	48.933	2911169	0.85	359632	1.28	8.09		
13	52.253	52.083	52.433	1164867	0.34	145680	0.52	8.00		
14	54.088	53.908	54.258	1426248	0.42	177722	0.63	8.03		
15	55.093	54.908	55.308	1029776	0.30	126384	0.45	8.15		
				343043685	100.00	27994148	100.00			

Anexo A13– Cromatograma de uma amostra do Leite Humano



Peak Report TIC										
Peak#	RTime	ITime	FTime	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	14.489	14.350	14.683	3556942	1.03	357270	1.29	9.96		
2	19.669	19.492	19.875	15779446	4.59	1638356	5.90	9.63		
3	26.418	26.250	26.592	14291583	4.16	1645691	5.93	8.68		
4	33.889	33.575	34.075	76800811	22.35	5676350	20.46	13.53		
5	34.989	34.817	35.167	11769530	3.42	1429178	5.15	8.24		
6	41.056	40.808	41.258	27646441	8.04	2441682	8.80	11.32		
7	42.148	41.767	42.267	91462069	26.61	5583874	20.12	16.38		
8	42.316	42.267	42.467	7847935	2.28	1393256	5.02	5.63	V	
9	43.930	43.592	44.242	75303317	21.91	5398001	19.45	13.95		
10	45.995	45.717	46.242	7792682	2.27	861538	3.10	9.05		
11	46.977	46.792	47.217	1486472	0.43	152876	0.55	9.72		
12	48.749	48.542	48.917	2013709	0.59	255958	0.92	7.87		
13	50.535	50.292	50.767	2521844	0.73	291575	1.05	8.65		
14	51.580	51.367	51.792	2094184	0.61	242652	0.87	8.63		
15	52.247	51.792	52.442	3302086	0.96	378965	1.37	8.71	V	
				343669051	100.00	27747222	100.00			

Anexo A14 - Método utilizado para a cromatografia gasosa no cromatógrafo gasoso CG-2010 Shimadzu com detector MS-QP2010 Plus

C:\GCMSsolution\Data\FAV\Marcio\coluna marcio 60m\Marcio-definitivo-60m.qgm

Method

[Comment]

==== Analytical Line 1 =====

[GC-2010]

Column Oven Temp. :140.0 °C
 Injection Temp. :260.00 °C
 Injection Mode :Split
 Flow Control Mode :Linear Velocity
 Pressure :18.6 kPa
 Total Flow :7.4 mL/min
 Column Flow :0.40 mL/min
 Linear Velocity :23.9 cm/sec
 Purge Flow :5.0 mL/min
 Split Ratio :5.0
 High Pressure Injection :OFF
 Carrier Gas Saver :OFF
 Splitter Hold :OFF
 Oven Temp. Program

Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	140.0	5.00
2.00	240.0	1.00

< Ready Check Heat Unit >

Column Oven : Yes
 SPL1 : Yes
 MS : Yes

< Ready Check Detector(FID) >

< Ready Check Baseline Drift >

< Ready Check Injection Flow >

SPL1 Carrier : Yes
 SPL1 Purge : Yes

< Ready Check APC Flow >

< Ready Check Detector APC Flow >

External Wait :No
 Equilibrium Time :3.0 min

[GC Program]

[GCMS-QP2010 Plus]

IonSourceTemp :260.00 °C
 Interface Temp. :260.00 °C
 Solvent Cut Time :10.00 min
 Detector Gain Mode :Relative
 Detector Gain :0.00 kV
 Threshold :1000

[MS Table]

--Group 1 - Event 1--

Start Time :10.00min
 End Time :56.00min
 ACQ Mode :Scan
 Event Time :0.50sec
 Scan Speed :666
 Start m/z :40.00
 End m/z :350.00

Sample Inlet Unit :GC

[MS Program]

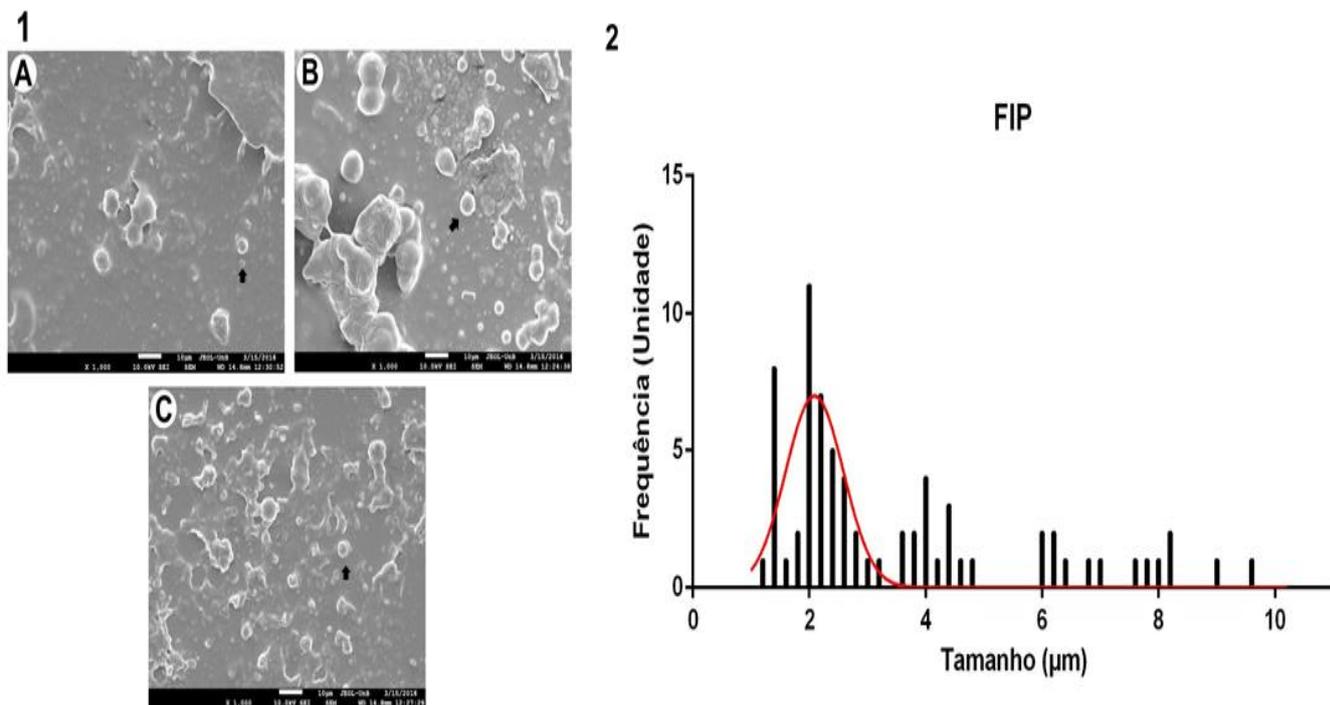
Use MS Program :OFF

Anexo B – Certificado de Aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisas

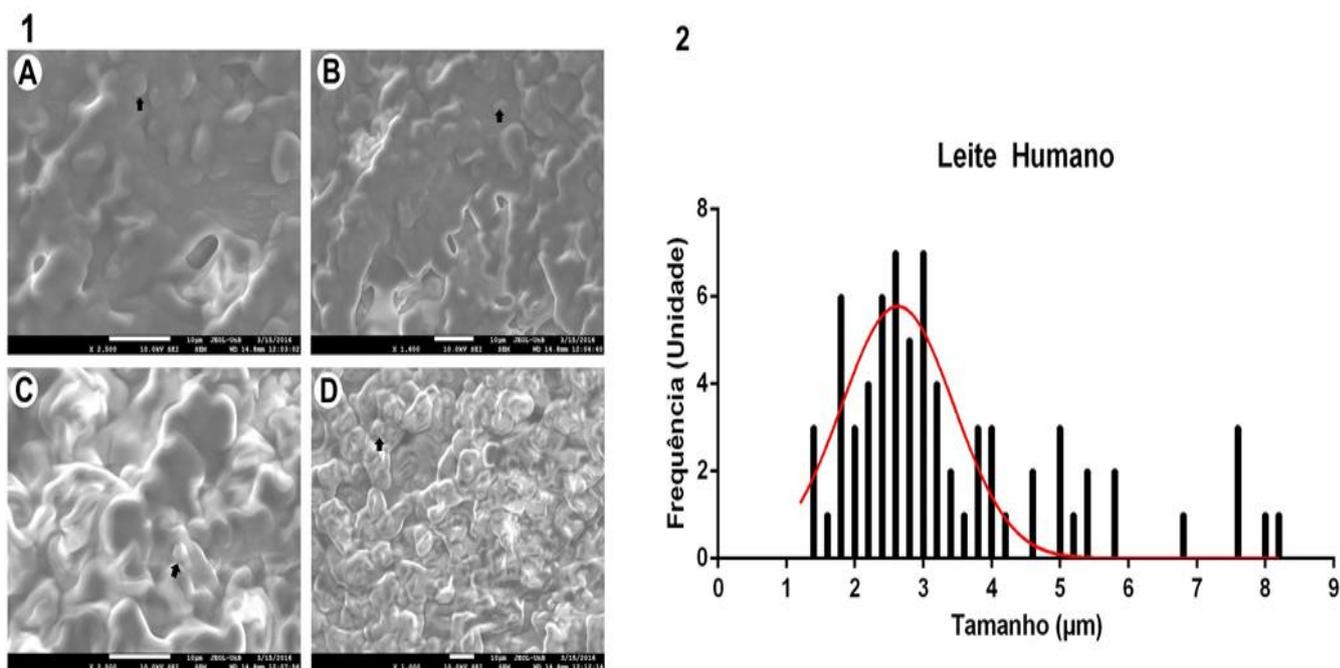
- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
<p>Título da Pesquisa: COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E SUA DISTRIBUIÇÃO NAS CADEIAS DE TRIACILGLICERÓIS EM FÓRMULAS INFANTIS</p> <p>Pesquisador Responsável: Marcio Antonio Mendonça</p> <p>Área Temática:</p> <p>Versão: 2</p> <p>CAAE: 44750415.6.0000.5558</p> <p>Submetido em: 31/07/2015</p> <p>Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA</p> <p>Situação da Versão do Projeto: Aprovado</p> <p>Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável</p> <p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p>	
Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_407021	

- DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA											
<ul style="list-style-type: none"> ▼ Versão em Tramitação (E1) - Versão 3 <ul style="list-style-type: none"> ▼ Emenda (E1) - Versão 3 <ul style="list-style-type: none"> ▼ Documentos do Projeto <ul style="list-style-type: none"> Folha de Rosto - Submissão 1 Outros - Submissão 1 Projeto Detalhado / Brochura Investigad ▼ Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 2 ▼ Projeto Completo 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tipo de Documento</th> <th>Situação</th> <th>Arquivo</th> <th>Postagem</th> <th>Ações</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações					
Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações							

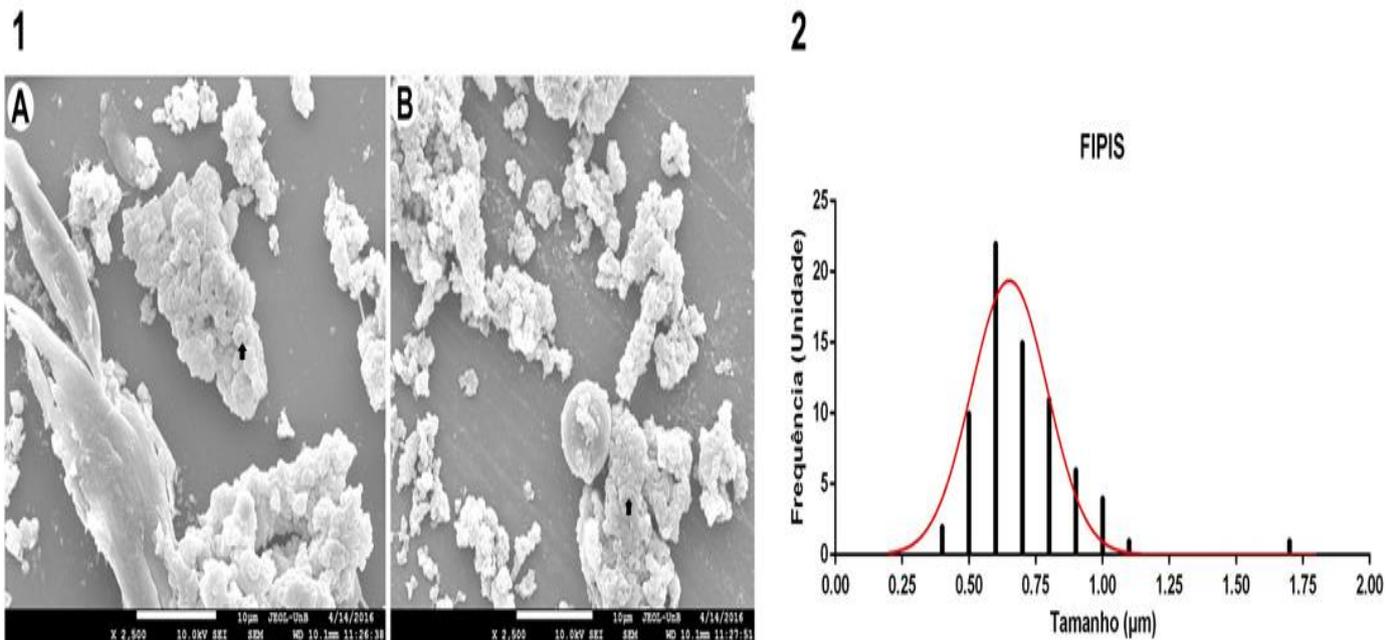
- LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO							
Apreciação	Pesquisador Responsável	Versão	Submissão	Modificação	Situação	Exclusiva do Centro Coord.	Ações
E1	Marcio Antonio Mendonça	3			Em Edição		  
PO	Marcio Antonio Mendonça	2	31/07/2015	01/10/2015	Aprovado	Não	 



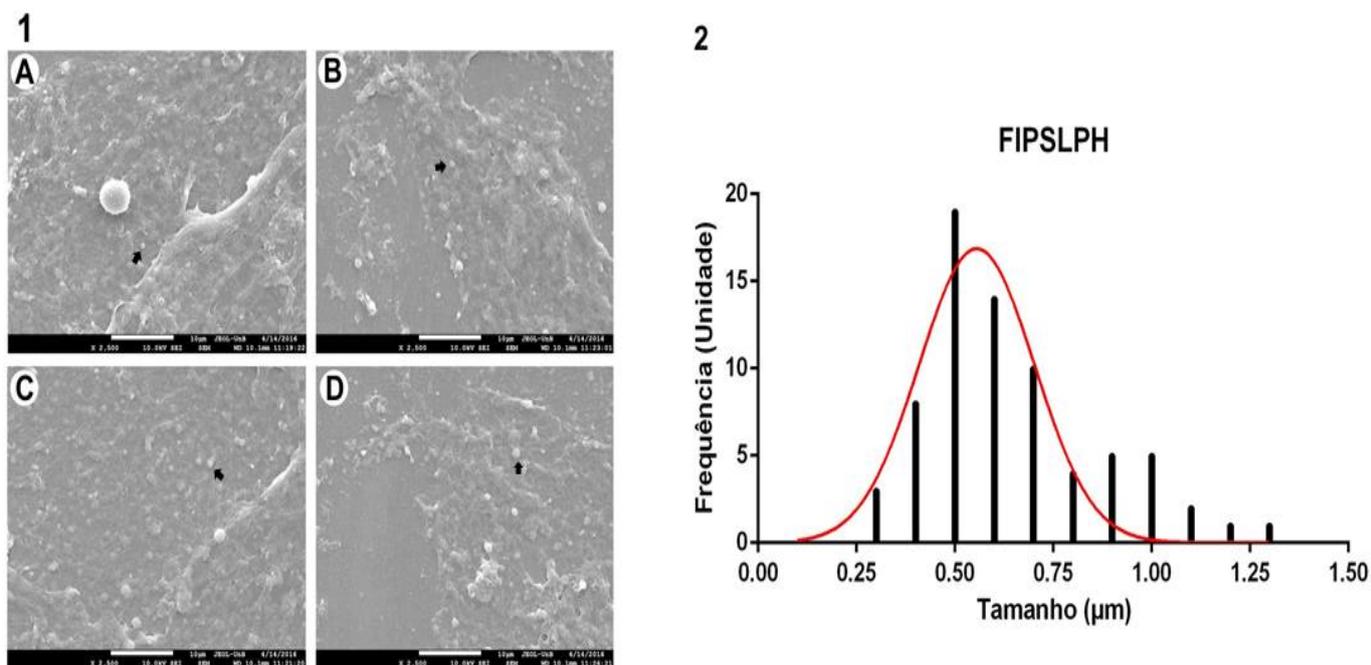
Anexo C1- Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura da fórmula infantil FIP



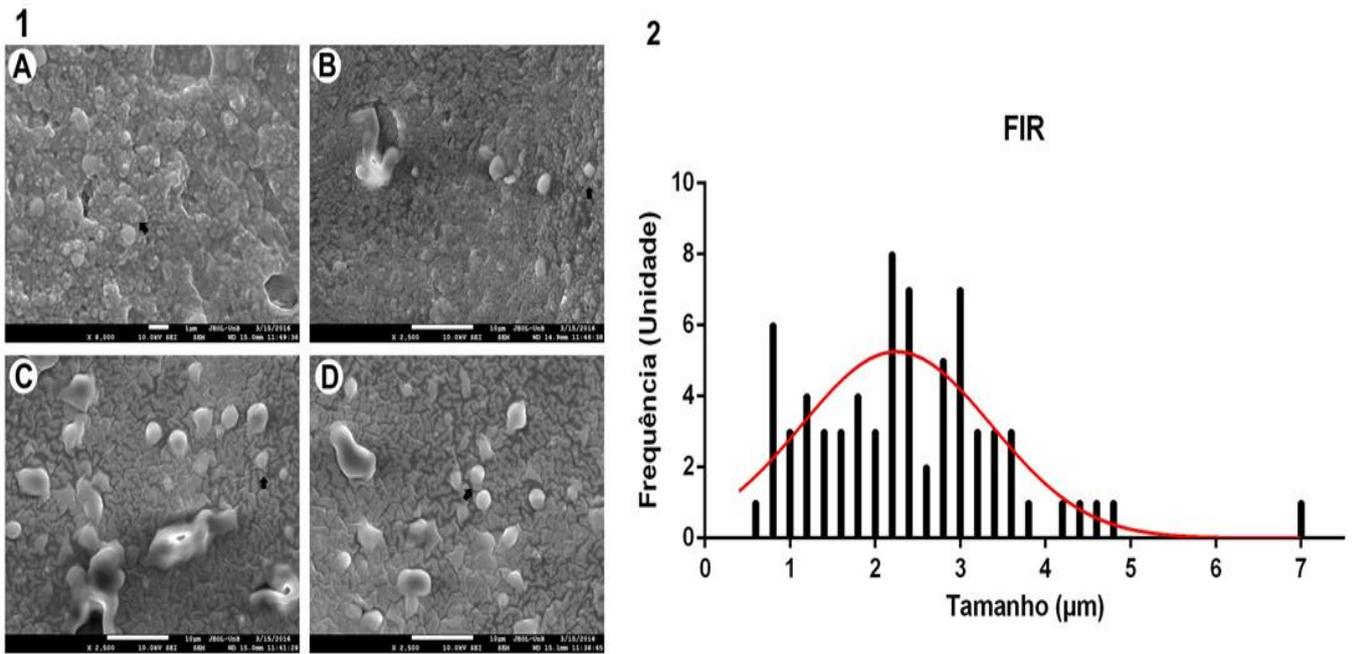
Anexo C2- Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura do Leite Humano



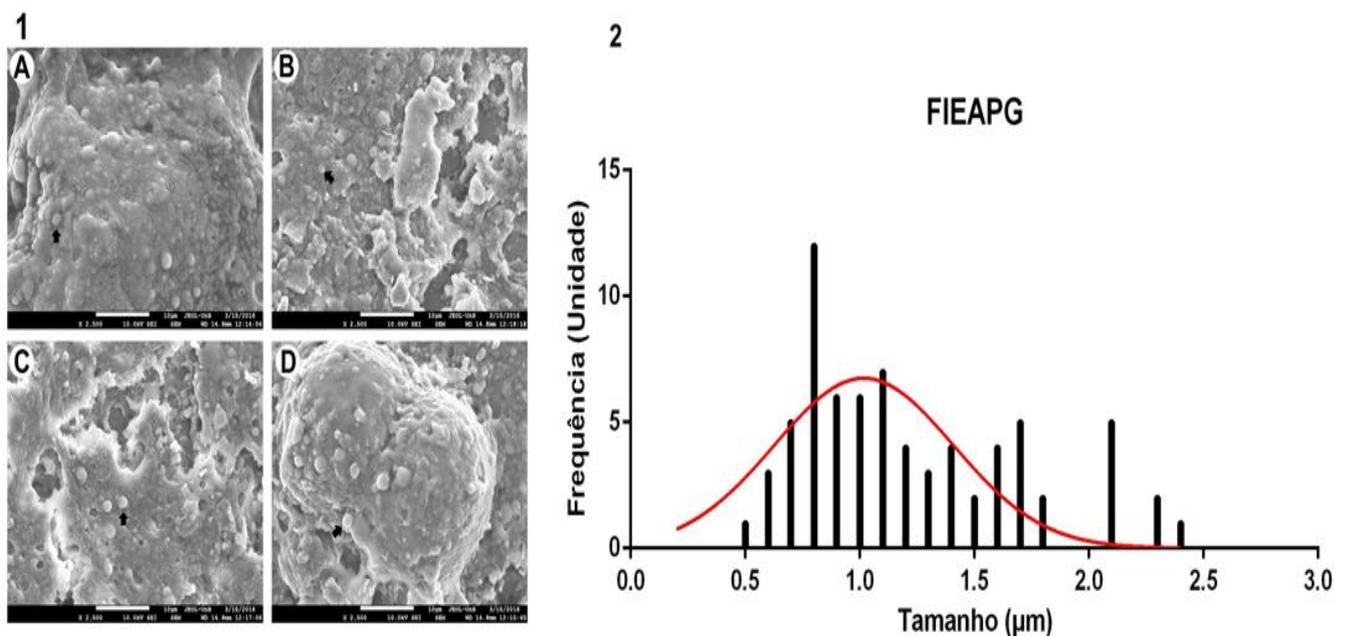
Anexo C3- Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura da fórmula infantil FIPIS



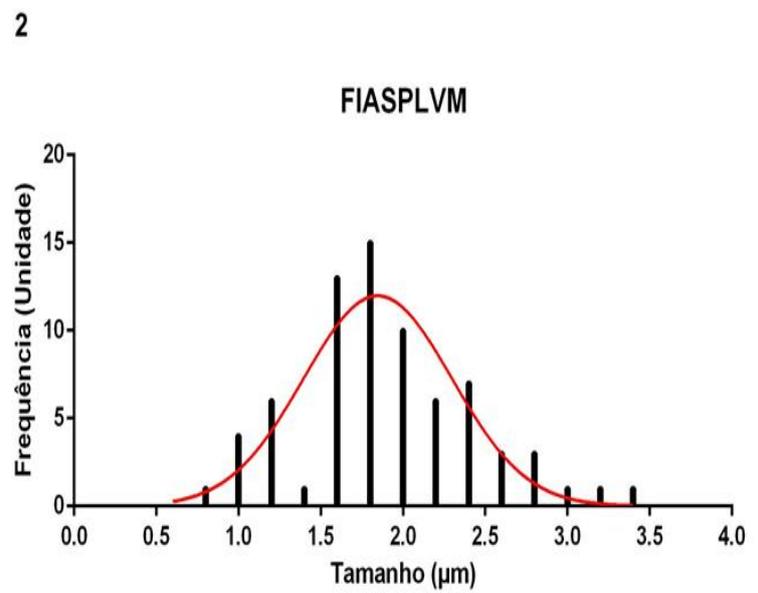
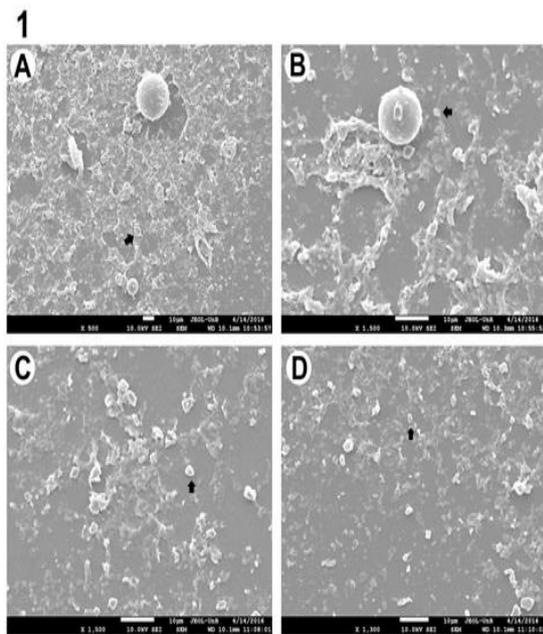
Anexo C4- Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura da fórmula infantil FIPSLPH



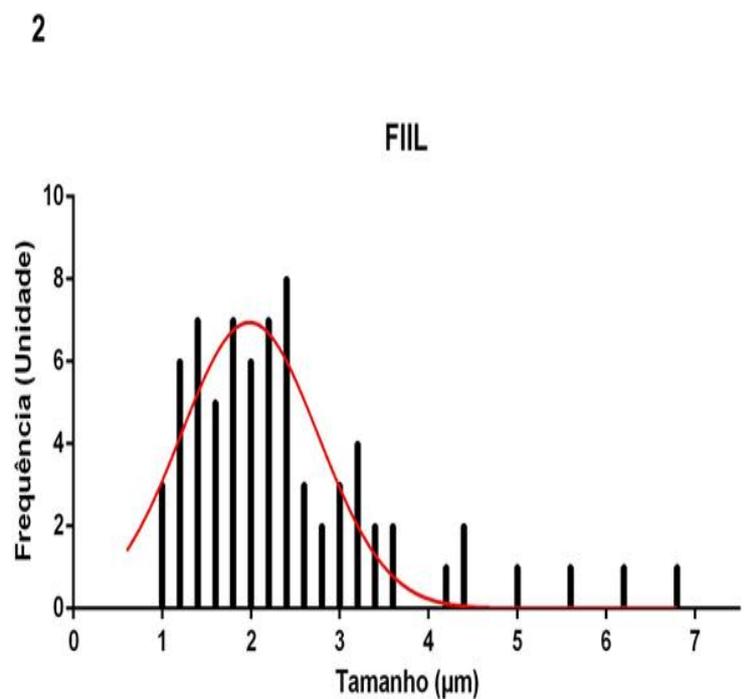
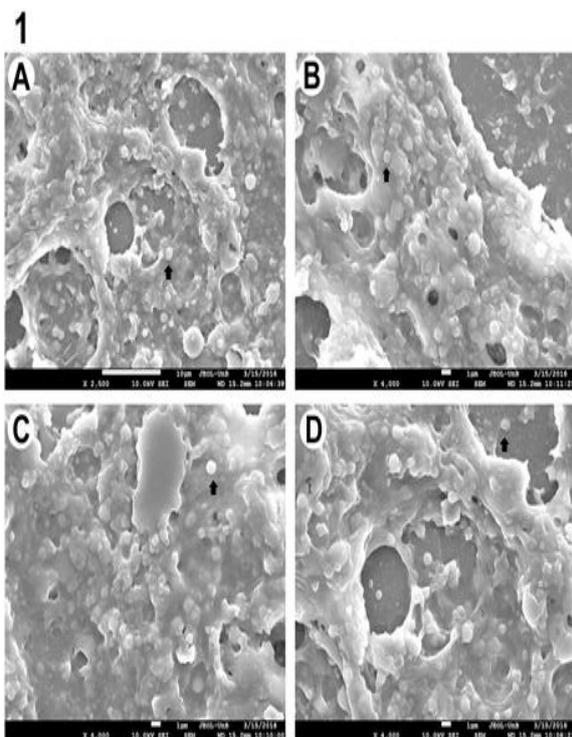
Anexo C5- Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura da fórmula infantil FIR



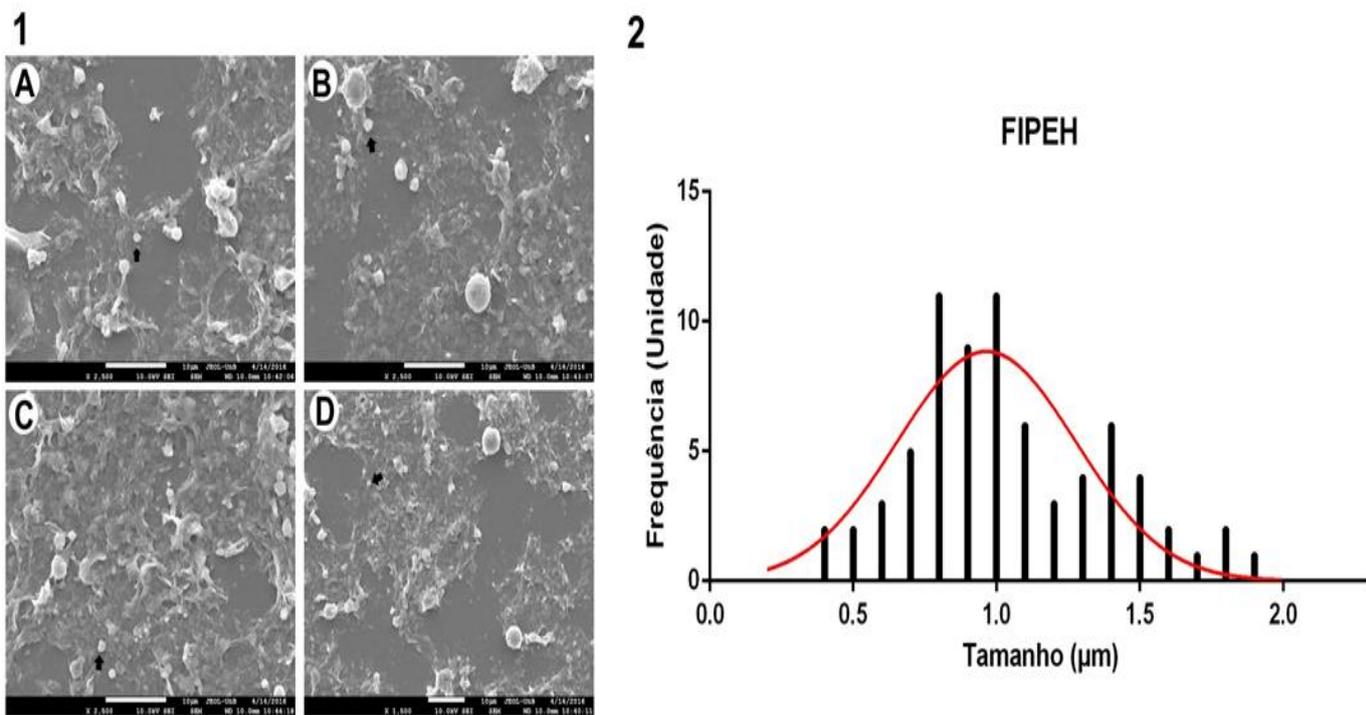
Anexo C6- Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura da fórmula infantil FIEAPG



Anexo C7- Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura da fórmula infantil FIASPLVM



Anexo C8- Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura da fórmula infantil FIIL



Anexo C9- Micrografia e histograma de distribuição de frequência dos glóbulos de gordura da fórmula infantil FIPEH