



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos**

**TECNOLOGIAS PARA CONSERVAÇÃO DE LEITE HUMANO EM PÓ**  
**E SORO DE LEITE HUMANO: UMA PROPOSTA PARA**  
**INTRODUÇÃO ALIMENTAR**

**ELOIZE DA SILVA ALVES**

Maringá

2024

**ELOIZE DA SILVA ALVES**

**TECNOLOGIAS PARA CONSERVAÇÃO DE LEITE HUMANO EM PÓ  
E SORO DE LEITE HUMANO: UMA PROPOSTA PARA  
INTRODUÇÃO ALIMENTAR**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.

*Oscar de O. Santos Junior.*

---

**Prof. Dr. Oscar Oliveira Santos Junior**

*Andresa Carla Feihmann*

---

**Profa. Dra. Andresa Carla Feihmann**

*Paulo Ricardo de Souza*

---

**Prof. Dr. Paulo Ricardo de Souza**

*Suelen Siqueira dos Santos*

---

**Profa. Dra. Suelen Siqueira dos Santos**

*Jesui Vergilio Visentainer*

---

**Prof. Dr. Jesui Vergilio Visentainer  
Orientador**

Maringá

2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

A474t

Alves, Eloize da Silva

Tecnologias para conservação de leite humano em pó e soro de leite humano : uma proposta para introdução alimentar / Eloize da Silva Alves. -- Maringá, PR, 2024.  
94 f. : color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Jesui Vergilio Visentainer.

Coorientador: Prof. Dr. Grasielle Scaramal Madrona.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2024.

1. Leite humano (conservação). 2. Leite humano (encapsulação). 3. Leite humano (nutrientes). 4. Leite humano (liofilização). I. Visentainer, Jesui Vergilio, orient. II. Madrona, Grasielle Scaramal, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDD 23.ed. 613.269

**Orientador**

Prof. Dr. Jesui Vergilio Visentainer

**Co-Orientadora**

Profa. Dra. Grasiela Scaramal Madrona

## **BIOGRAFIA**

Eloize da Silva Alves, nascida em Umuarama – Paraná. Possui graduação em Tecnologia em Alimentos, e mestrado em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Maringá. Tem experiência na área de Tecnologia e Ciência de Alimentos atuando principalmente com tecnologia de alimentos, com ênfase em estudos direcionados ao uso de polímeros naturais para encapsulação como novas tecnologias de conservação; além de processamentos de conservação de leite humano como, liofilização, pasteurização, *spray drying* e alta pressão hidrostática.

***Dedico***

*A todo o amor dos meus pais Rozeney e Donizeti, e ao apoio na realização de minhas conquistas.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que me concedeu força, coragem, saúde e graça para superar cada desafio ao longo desta jornada.

À minha família, Rozeney e Donizeti, meus pais, agradeço o apoio e amor incondicional, e à Denise e Gustavo, meus irmãos, agradeço, todo incentivo.

Ao meu namorado Junior, por compartilhar meus sonhos, enfrentar os dias difíceis ao meu lado e pelo amor e paciência incondicional que foi essencial para eu alcançar este objetivo.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Jesui Visentainer, pela oportunidade, pelo direcionamento, pelas grandes experiências compartilhadas e por todo o suporte com tanta disposição.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Grasielle Madrona, sou profundamente grata pelos ensinamentos, sempre com tanto carinho e humanidade, e pela paciência com meus desesperos.

Ao prof. Dr. Oscar Oliveira, agradeço a empatia, conselhos, e supervisão diária.

Ao grupo de pesquisa APLE-A, pela união e experiências compartilhadas. Em especial, aos meus amigos, Bruno Saqueti e Matheus Castro, que me acompanham desde o início na pós-graduação, obrigada pela forte e verdadeira amizade. Às minhas amigas Rafaella, Joice, Cintia e Talita, minhas companheiras de pesquisa, obrigada por toda colaboração. À Luciana, Adriela, Geovane e Patricia Santos que me ensinaram muito sobre pesquisa e foram ótimas companhias.

Ao André, técnico do laboratório, que partiu cedo demais, agradeço a presteza e boas conversas durante nosso convívio.

Ao grupo de pesquisa MFB, do Instituto Politécnico de Bragança (Portugal), agradeço a oportunidade do estágio de doutorado-sanduíche, que foi uma grande conquista. Em especial à prof. Dra. Maria Filomena Barreiro pela orientação, e à Tatiana, Liandra e Paula pelo suporte durante esta etapa.

Ao Banco de leite humano (HUM-UEM), COMCAP (UEM), Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG-UEM), e Laboratório de Tecnologias Emergentes da Universidade de Campinas (UNICAMP) pela disponibilidade e parceria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPC), agradeço a oportunidade de vivenciar esta etapa da vida acadêmica e a todo o corpo docente do programa pelos conhecimentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária, Fundação Cargill e Programa Pesquisa para o SUS, agradeço o suporte financeiro e apoio concedido.

## APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está apresentada na forma de dois artigos científicos publicados em periódicos

### **Artigo 1**

**Autores:** Eloize Silva Alves, Cintia Stefhany Ripke Ferreira, Paulo Ricardo Souza, Andressa Rafaella Silva Bruni, Matheus Campos Castro, Bruno Henrique Figueiredo Saqueti, Oscar Oliveira Santos, Grasielle Scaramal Madrona e Jesui Vergilio Visentainer

**Título:** Freeze-dried human milk microcapsules using gum arabic and maltodextrin: an approach to improving the solubility

**Revista:** International Journal of Biological Macromolecules

**Situação:** Publicado

**DOI:** <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124100>

### **Artigo 2**

**Autores:** Eloize Silva Alves, Matheus Campos Castro, Bruno Henrique Figueiredo Saqueti, Luciana Pelissari Manin, Josiane Bazzo Alencar, Joana Maira Valentini Zacarias, Andressa Rafaella Silva Bruni, Grasielle Scaramal Madrona, Jeane Eliele Laguila Visentainer, Marcelo Cristianini, Oscar Oliveira Santos e Jesui Vergilio Visentainer

**Título:** Impact of Conservation Processes on the Lipid Profile and Immunological Factors IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in Whey Separated from Discarded Human Milk

**Revista:** Journal of the Brazilian Chemical Society

**Situação:** Publicado

**DOI:** <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20230102>

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Human milk (HM) is a complete food, essential for healthy child development due to its nutritional and bioactive properties. Human milk banks are responsible for meeting the needs of newborns who do not have this food available, carrying out activities ranging from collecting donated human milk, quality control, processing and distribution. However, some challenges are evident, related to the rigorous quality control and the limited shelf life of traditional processing methods, such as Holder pasteurization and freeze-drying. In this context, the use of new technologies may be a promising alternative to improve the conservation of human milk nutrients. Innovative methods employing encapsulation or new processing can contribute to ensuring stability, extending shelf life, and facilitating access to the product for infant feeding.

**AIMS: Article 1** – To produce and evaluate the human milk microencapsulation by freeze-drying (using maltodextrin and gum arabic as individual wall materials and a combination of the two) to improve technological characteristics and rehydration, as well as an investigation of chemical interactions, morphology, and particle size distribution was conducted. **Article 2** – To evaluate the lipid quality through the determination of the triacylglycerol profile, fatty acid composition, nutritional indexes, as well as the maintenance of immunological compounds by the concentrations of the cytokines interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in human whey under different processes (pasteurization Holder, freeze-drying, spray drying, high hydrostatic pressure), comparing them with control human whey (untreated).

**MATERIAL AND METHODS:** The studies were approved by the local research ethics committee n° 3.430.478, and mature human milk was collected following protocols set by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Article 1** – Four samples containing human milk were produced: one sample without encapsulant (CONTROL), and three encapsulated with natural polymers (maltodextrin - HMMALT, gum arabic - HMGARA and a combination of both - HMMARA) in a ratio of 9:1 (human milk:polymer, w/w). All samples were homogenized, and then frozen at -18 °C for 24 h to prepare for freeze-drying. The samples were freeze-dried in a freeze dryer at approximately -52°C and 0.031 mbar for about 48 h. The yield of the freeze-drying process was calculated based on the initial and final mass measurements. Their characteristics were analyzed, including moisture content, hygroscopicity, activity water (Aw), dissolution time, solubility index, instrumental color, chemical interactions by infrared spectroscopy, powder morphology using scanning electron microscopy, particle size distribution, particle homogeneity, and encapsulation efficiency. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ( $p < 0.05$ ) with Statistic 7.0. **Article 2** – Human whey was separated by centrifugation and subjected to different processing methods (Holder pasteurization, freeze-drying, spray drying, and high-pressure processing) for comparison with untreated human whey (CONTROL). Holder pasteurization (PW) and freeze-drying (FDW) were carried out according to recommended practices for human milk banks. The spray drying (SDW) technique was applied using a mini spray dryer with an inlet temperature of 175°C and an outlet temperature of 103°C. High-pressure processing (HHPW) was performed using a high-pressure equipment at 600 MPa with an initial temperature of 4°C and a final temperature of 17.35°C. For reconstitution and analysis of the powdered samples (FDW and SDW), yield calculations were based on the recovered solid content. The impact of the processing methods was evaluated in terms of lipid profile assessed by mass spectrometry, fatty acid composition using gas chromatography, and lipid nutritional indices calculated based on the defined fatty acid composition. Additionally, the immunological content of IL-10 and

TGF- $\beta$ 1 was measured using an immunoenzymatic kit. The results were analyzed using Rstudio for ANOVA, Tukey's test ( $p < 0.05$ ), and Principal Component Analysis (PCA).

**RESULTS AND DISCUSSION: Article 1** – The freeze-drying process was effective in encapsulating human milk, increasing yield by over 40%, due to the addition of the polymers maltodextrin and gum arabic, which increased the solids content. Additionally, encapsulation demonstrated reductions in moisture content and  $A_w$ , consequently decreasing susceptibility to deterioration reactions. The moisture content and  $A_w$  of the encapsulated samples were lower than those found in the CONTROL (moisture =  $4.75 \pm 0.04$ ,  $A_w = 0.3921 \pm 0.0210$ ), with moisture content after encapsulation ranging from  $2.82 \pm 0.02$  (HMGARA) to  $4.05 \pm 0.09$  (HMMALT) and  $A_w$  from  $0.1474 \pm 0.0139$  (LHGARA) to  $0.2515 \pm 0.0071$  (HMMALT). The hygroscopicity index was not altered by encapsulation, remaining within the satisfactory range for powdered products ( $8.33 \pm 0.30$  to  $9.44 \pm 0.02$ ). Moreover, the encapsulated samples exhibited rapid dissolution, with HMGARA dissolving completely in  $55.05 \pm 15.44$  s, five times faster than the CONTROL ( $275.41 \pm 9.64$  s). The solubility index increased when compared between CONTROL ( $94.67 \pm 0.12$ ) and HMGARA ( $98.29 \pm 0.36$ ), justified by the material's chelating and emulsifying properties, and with HMMALT ( $95.56 \pm 0.89$ ) due to its high hydrophilic capacity. Color changes were evaluated using  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E$ , WI, and  $Y_i$  parameters. HMMALT ( $93.10 \pm 0.74$ ) showed greater whiteness ( $L^*$ ) and a significant difference compared to CONTROL ( $90.22 \pm 0.14$ ), reflecting light exposure and dispersion by casein micelles and the fat globule membrane. The  $a^*$  and  $b^*$  parameters indicated tendencies towards green and yellow colors, respectively, due to the human milk matrix assuming colors related to the lactating mother's diet. The total color difference ( $\Delta E$ ), using CONTROL as a reference, showed all samples to be very distinct, with HMMARA ( $3.53 \pm 0.18$ ) exhibiting the smallest distinction. The WI and  $Y_i$  indices showed expected results, with higher WI in HMMALT ( $87.41 \pm 0.41$ ) due to the characteristic color of the polymer and higher  $Y_i$  in CONTROL ( $30.67 \pm 0.15$ ) related to the biological activities of human milk. Infrared spectra revealed interactions between the encapsulating materials and the matrix, indicating the formation of protective barriers. The encapsulation process altered the morphology of the CONTROL, reducing particle aggregation and exposure of components, demonstrating efficient deposition of the wall material as a protective barrier, with particular emphasis on the evident emulsifying potential of HMGARA. The characterization of particle size distribution and homogeneity in water showed that the encapsulation process increased particle size, with values of 305.5 nm (HMMALT), 246.9 nm (HMGARA), and 319.1 nm (HMMARA), while the non-encapsulated samples ranged from 155.6 nm (human milk liquid - HMLIQ) to 200 nm (CONTROL). This size increase, provided by the encapsulating agents, favors stability during reconstitution. The polydispersity index (Pdi), which measures particle homogeneity, was lower in the encapsulated samples (HMMALT: 0.377, HMGARA: 0.345, HMMARA: 0.294) compared to HMLIQ (0.468) and CONTROL (0.398), indicating particle organization. Furthermore, the encapsulation efficiency exceeded 85% in all encapsulated samples, demonstrating effective intermolecular interactions due to the properties offered by gum arabic and maltodextrin.

**Article 2** – Mass spectra revealed changes in the lipid profile according to the highest spectral ion formed between  $m/z$  900-904 in CW, while the processed samples PW and FDW exhibited their highest intensities between  $m/z$  874-878, SDW in the  $m/z$  684 region, and HHPW in the  $m/z$  656 region. These results suggest that the  $m/z$  distribution is indicative of lipid disruption during triacylglycerol formation after processing. The fatty acid composition revealed significant variations, with CW showing the highest content ( $562.37 \pm 13.44$ ), indicating that the processing methods alter the lipid profile. Moreover, PW ( $378.62 \pm 7.93$ ) and FDW ( $393.36 \pm 33.70$ ) had similar contents, suggesting that the pasteurization used in both processes had a comparable effect. HHPW had the lowest content ( $248.99 \pm 6.50$ ), indicating greater lipid disruption. The polyunsaturated fatty acid (PUFA) content influenced the

nutritional lipid indices, with PUFA/SFA ratios ranging from  $0.14 \pm 0.00$  (CW) to  $0.47 \pm 0.02$  (PW), n-6/n-3 ratios from  $13.29 \pm 1.00$  (HHPW) to  $28.29 \pm 0.59$  (CW), LA/ALA ratios from  $19.63 \pm 0.36$  (FDW) to  $42.55 \pm 2.36$  (CW), and EPA+DHA ratios from  $0.55 \pm 0.05$  (PW) to  $0.26 \pm 0.01$  (CW). The importance of fatty acid consumption for proper neurodevelopment, cardiac functions, and cholesterol metabolism is emphasized. The H/H values ranged from  $1.37 \pm 0.04$  (PW) to  $0.44 \pm 0.01$  (CW), while IA and IT values ranged from  $1.13 \pm 0.04$  (PW) to  $3.88 \pm 0.05$  (CW), and  $1.21 \pm 0.03$  (PW) to  $2.50 \pm 0.02$  (CW), respectively. The 12:0, 14:0, and 16:0 groups were attributed as hypercholesterolemic, thrombogenic, and atherogenic fatty acids, found in greater amounts in CW, while PUFAs, considered to have inhibitory functions, were maintained through pasteurization. The HPI indicated that the processing methods caused the release and reduction of plasma cholesterol concentrations in whey human. Immunological analysis revealed an increase in IL-10 levels after processing, with a more significant increase after HHPW ( $8.09 \pm 2.17$ ), suggesting that the process protects intermolecular interactions by not involving high temperatures. On the other hand, despite significant reductions in TGF- $\beta$ 1 attributed to the impact of each processing method, pasteurization led to an increase in TGF- $\beta$ 1 concentration to  $461.42 \pm 57.14$ , which may be explained by the release of cells into the aqueous fraction of whey human. PCA analysis explored similarities between the samples, highlighting the resemblance between PW and FDW, supported by their fatty acid composition. However, the greater preservation of important fatty acids was attributed to FDW, PW, and HHPW, while the IA and IT contents, associated with negative health effects, remained prominent in CW and SDW samples. Additionally, the highest IL-10 content was evident in HHPW, while no treatment showed significant effects on the maintenance of TGF- $\beta$ 1. Therefore, all results indicated individual effects in relation to the evaluated variables, suggesting that these should be assessed according to specific interests and needs.

**CONCLUSIONS:** The nutritional content present in human milk was preserved through the use of new technologies proposed in the studies. The encapsulation technique of human milk using maltodextrin and gum arabic as coating materials promoted increased stability in both powdered and reconstituted human milk. The encapsulation process demonstrated an efficiency of over 85%, indicating promising interactions in forming a protective barrier, which reduced the exposure of components present in human milk. Moreover, the application of processing methods to whey human significantly contributed to the nutritional and immunological support of the components found in human milk. The results showed individual variations in nutrient preservation and impact. Therefore, when recommending its use as a supplement for infant feeding introduction, the results should be considered based on consumer needs. Overall, these new technologies could offer significant advancements in preserving and stabilizing compounds in human milk, ensuring that newborns receive nutrition rich in essential nutrients for their development.

**Keywords:** Human milk; Conservation; Nutrients; Encapsulation; Processing.

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO:** O leite humano é um alimento completo, essencial para o desenvolvimento infantil saudável devido às suas propriedades nutricionais e bioativas. Os bancos de leite humano são responsáveis por atender necessidades de recém-nascidos que não possuem esse alimento disponível, efetuando atividades desde a coleta do leite humano doado, controle de qualidade, processamento e distribuição. No entanto, alguns desafios são evidentes, relacionados ao rigoroso controle de qualidade e à vida útil limitada dos métodos tradicionais de processamento, como a pasteurização Holder e a liofilização. Nesse contexto, o uso de novas tecnologias pode ser uma alternativa promissora para melhorar a conservação de nutrientes do leite humano. Métodos inovadores empregam a encapsulação ou novos processamentos podem contribuir assegurando a estabilidade, prolongando a vida útil, e facilitando o acesso ao produto para a alimentação infantil.

**OBJETIVOS:** **Artigo 1** – Produzir e avaliar a microencapsulação do leite humano por liofilização (usando maltodextrina e goma arábica como materiais de parede individuais e uma combinação dos dois) relacionando as características tecnológicas e a reidratação, tal como uma investigação de interações químicas, morfologia e distribuição de tamanho de partículas. **Artigo 2** – Avaliar a qualidade lipídica por meio da determinação do perfil de triacilgliceróis, composição de ácidos graxos, índices nutricionais, manutenção de compostos imunológicos interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento transformador  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) de soro de leite humano submetido a diferentes processamentos (pasteurização Holder, liofilização, secagem por atomização, alta pressão hidrostática), comparando-os com o soro de leite humano controle (não tratado).

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Os estudos foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa local nº 3.430.478, e o leite humano maduro foi coletado seguindo protocolos direcionados pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Artigo 1** – Foram produzidas quatro amostras contendo leite humano: uma amostra sem encapsulante (CONTROLE), e três encapsuladas com polímeros naturais (maltodextrina - LHMALT, goma arábica - LHGARA e uma combinação de ambas - LHMARA) em uma proporção de 9:1 (leite humano: polímero, p/p). Todas as amostras foram homogeneizadas, e então congeladas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h para preparação para liofilização. As amostras foram liofilizadas em um liofilizador a cerca de  $-52\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 0,031 mbar por aproximadamente 48 h. O rendimento da liofilização foi obtido através da relação entre medidas de massa inicial e massa final ao processo. Suas características foram analisadas englobando a determinação de umidade, atividade de água (Aw), higroscopicidade, tempo de dissolução, índice de solubilidade, cor instrumental, interações químicas por espectroscopia de infravermelho, morfologia do pó por microscopia eletrônica de varredura, distribuição de tamanho e homogeneidade de partículas e eficiência de encapsulação. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) usando Statistic 7.0. **Artigo 2** – O soro de leite humano foi separado por centrifugação, e submetido a diferentes processamentos (pasteurização Holder, liofilização, *spray drying* e alta pressão hidrostática) para comparação com o soro de leite humano não tratado (CW). A pasteurização Holder (PW) e a liofilização (FDW) foram efetuadas de acordo recomendado para bancos de leite humano. A técnica de *spray drying* (SDW) foi aplicada aplicando ar quente em fluxo de cone com temperatura de entrada a  $175\text{ }^{\circ}\text{C}$  e de saída a  $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A alta pressão hidrostática (HHPW) foi procedida empregando uma pressão de 600 MPa e controle de temperatura que variou de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $17,35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para a reconstituição e análises das amostras em pó (FDW e SDW) foram considerados cálculos de rendimento considerando o teor de sólidos recuperado. O impacto dos processamentos foi avaliado quanto ao perfil lipídico avaliado por espectrometria de massas, composição de ácidos graxos usando cromatografia

em fase gasosa e índices nutricionais lipídicos calculados considerando a composição de ácidos graxos definida. Além disso, o conteúdo imunológico de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 empregando teste com kit imuno-enzimático. Os resultados obtidos foram submetidos ao software Rstudio para análises ANOVA, teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ), e Análise de Componentes Principais (PCA).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO: Artigo 1** – O processo de liofilização foi eficaz para encapsular leite humano, aumentando o rendimento em mais de 40%, devido a adição dos polímeros maltodextrina e goma arábica, que aumentaram o teor de sólidos. Além disso, a encapsulação demonstrou reduções frente ao teor de umidade e  $A_w$ , diminuindo consequentemente a susceptibilidade de reações de deterioração. O teor de umidade e  $A_w$  das amostras encapsuladas foi inferior ao encontrado na CONTROLE (umidade =  $4,75 \pm 0,04$ ,  $A_w = 0,3921 \pm 0,0210$ ), variando o teor de umidade após encapsulação entre  $2,82 \pm 0,02$  (LHGARA) a  $4,05 \pm 0,09$  (HMMALT) e  $A_w$  entre  $0,1474 \pm 0,0139$  (LHGARA) e  $0,2515 \pm 0,0071$  (LHMALT). O índice de higroscopicidade não foi alterado pela encapsulação, permanecendo dentro da faixa satisfatória para produtos em pó ( $8,33 \pm 0,30$  a  $9,44 \pm 0,02$ ). Além disso, as amostras encapsuladas apresentaram rápido poder de dissolução, com LHGARA se dissolvendo completamente em  $55,05 \pm 15,44$  s, cinco vezes mais rápida que a CONTROLE ( $275,41 \pm 9,64$  s). O índice de solubilidade foi aumentado quando comparado entre CONTROLE ( $94,67 \pm 0,12$ ) e LHGARA ( $98,29 \pm 0,36$ ), justificadas pelas propriedades do material ao poder quelante e emulsificante, e com LHMALT ( $95,56 \pm 0,89$ ) devido sua alta capacidade hidrofílica. Alterações na cor foram avaliadas pelos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E$ , WI e  $Y_i$ . A LHMALT ( $93,10 \pm 0,74$ ) apresentou maior brancura ( $L^*$ ) e diferença significativa em relação ao CONTROLE ( $90,22 \pm 0,14$ ), que reflete a exposição e dispersão de luz pelas micelas de caseína e a membrana do glóbulo de gordura. Os parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  indicaram tendências às cores verde e amarelo, respectivamente, devido a matriz leite humano assumir cores relacionadas a ingestão alimentar da lactante. A diferença total de cor ( $\Delta E$ ), usando o CONTROLE como referência, mostrou todas as amostras como muito distintas, com destaque a LHMARA ( $3,53 \pm 0,18$ ) exibindo a menor distinção. Os índices WI e  $Y_i$  tiveram resultados esperados, com maior WI em LHMALT ( $87,41 \pm 0,41$ ) devido cor característica do polímero e maior  $Y_i$  no CONTROLE ( $30,67 \pm 0,15$ ) relacionado às atividades biológicas do leite humano. Os espectros de infravermelho revelaram interações entre os materiais encapsulantes e a matriz, indicando a formação de barreiras protetoras. O processo de encapsulação alterou a morfologia do CONTROLE, reduzindo agregação de partículas e exposição de componentes, demonstrando deposição eficiente do material de parede como barreira protetora, dado destaque ao evidente potencial emulsificante da LHGARA. A caracterização da distribuição de tamanho e homogeneidade das partículas em água mostrou que o processo de encapsulação aumentou o tamanho das partículas, com valores de 305,5 nm (LHMALT), 246,9 nm (LHGARA) e 319,1 nm (LHMARA), enquanto as amostras não encapsuladas variaram entre 155,6 nm (leite humano líquido - LHLIQ) e 200 nm (CONTROLE). Esse aumento de tamanho, proporcionado pelos agentes encapsulantes, favorece a estabilidade na reconstituição. O índice de polidispersibilidade (Pdi), que mede a homogeneidade das partículas, foi menor nas amostras encapsuladas (LHMALT: 0,377, LHGARA: 0,345, LHMARA: 0,294) em comparação com o LHLIQ (0,468) e CONTROLE (0,398), indicando organização das partículas. Além disso, a eficiência de encapsulação foi superior a 85% em todas as amostras encapsuladas, demonstrando interações intermoleculares eficazes diante as propriedades da goma arábica e da maltodextrina oferecidas. **Artigo 2** – Os espectros de massa revelaram alterações ao perfil lipídico de acordo o maior íon espectral formado entre  $m/z$  900-904 no CW, enquanto as amostras processadas PW e FDW exibiram suas maiores intensidades entre  $m/z$  874-878,

e SDW na região  $m/z$  684, e HHPW na região de  $m/z$  656. Estes resultados sugerem pela distribuição de  $m/z$ , atribuindo a desestruturação lipídica da formação dos triacilgliceróis após processamento. A composição de ácidos graxos revelou variações significativas, com CW apresentando o maior conteúdo ( $562,37 \pm 13,44$ ), indicando que os processamentos alteram o perfil lipídico, além disso, teve conteúdo semelhante entre PW ( $378,62 \pm 7,93$ ) e FDW ( $393,36 \pm 33,70$ ), sugerindo que a pasteurização praticada em ambos teve um efeito similar, e, HHPW apresentou o menor teor ( $248,99 \pm 6,50$ ), indicando maior desestruturação lipídica. O teor de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) influenciou os índices nutricionais lipídicos com variações de AGPI/AGS entre de  $0,14 \pm 0,00$  (CW) a  $0,47 \pm 0,02$  (PW), n-6/n-3 de  $13,29 \pm 1,00$  (HHPW) a  $28,29 \pm 0,59$  (CW), LA/ALA de  $19,63 \pm 0,36$  (FDW) a  $42,55 \pm 2,36$  (CW) e EPA+DHA de  $0,55 \pm 0,05$  (PW) a  $0,26 \pm 0,01$  (CW). Ressalta-se a importância do consumo de ácidos graxos para funções adequadas ao neurodesenvolvimento, funções cardíacas e metabolismo do colesterol. Ao H/H foram observados valores entre  $1,37 \pm 0,04$  (PW) e  $0,44 \pm 0,01$  (CW), enquanto de IA e IT variaram de  $1,13 \pm 0,04$  (PW) a  $3,88 \pm 0,05$  (CW), e  $1,21 \pm 0,03$  (PW) a  $2,50 \pm 0,02$  (CW), respectivamente, onde os grupos 12:0, 14:0 e 16:0 foram atribuídos como ácidos graxos hipocolesterolêmicos, trombogênicos, e aterogênicos demonstrados com maior presença na amostra CW, enquanto os AGPIs considerados de funções inibidoras tiveram manutenção do conteúdo pela pasteurização. O HPI indicou que após os processamentos foi provocado liberações e diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol no soro. A análise imunológica revelou um aumento nos níveis de IL-10 após os processamentos, sendo mais significativo após HHPW ( $8,09 \pm 2,17$ ), sugerindo ser favorecido pelo processo não envolver temperaturas protege as interações intermoleculares. Por outro lado, apesar das reduções significativas atribuídas pelo impacto de cada processamento na TGF- $\beta$ 1, após a pasteurização este componente teve aumento na concentração para  $461,42 \pm 57,14$ , o que pode ser justificado pela liberação da célula na fração aquosa de soro de leite humano. A análise de PCA explorou similaridades entre as amostras, destacando a semelhança entre PW e FDW corroborada pela composição de ácidos graxos. No entanto, a maior preservação pelo maior número de ácidos graxos importantes foi atribuída a FDW, PW e HHPW, enquanto o conteúdo de IA e IT que correspondem a efeitos negativos à saúde, permaneceu direcionado as amostras CW e SDW. Adicionalmente, o maior conteúdo de IL-10 foi evidente em HHPW, enquanto nenhum tratamento mostrou efeitos significativos para a manutenção de TGF- $\beta$ 1. Portanto, todos os resultados indicaram efeitos individuais frente as variáveis avaliadas, assim sugere-se que devem ser avaliadas de acordo o interesse e necessidades.

**CONCLUSÃO:** O conteúdo nutricional presente no leite humano foi conservado pelo uso de novas tecnologias. Além disso, a estabilidade do leite humano em pó e reconstituído foi aprimorada pela técnica de encapsulação, utilizando maltodextrina e goma arábica como materiais de revestimento. O processo de encapsulação demonstrou uma eficiência superior a 85%. A encapsulação proporcionou reduções na exposição de componentes presentes no leite humano, mostrando promissoras interações na formação de uma barreira protetora. Além disso, a aplicação de processamentos no soro de leite humano pôde contribuir significativamente para o suporte nutricional e imunológico de componentes presentes no leite humano. Os resultados indicaram variações individuais na preservação e impacto dos nutrientes. Portanto, ao recomendar para uso como suplemento na introdução alimentar infantil, os resultados devem ser considerados de acordo as necessidades do consumidor. No geral, estas novas tecnologias podem oferecer avanços significativos na capacidade de preservar e estabilizar compostos do leite humano, garantindo que recém-nascidos recebam uma alimentação rica em nutrientes essenciais para seu desenvolvimento.

**Palavras-chave:** Leite humano; Conservação; Nutrientes; Encapsulação; Processamentos.

## ARTIGO 1

### **Microcápsulas de leite humano liofilizado usando goma arábica e maltodextrina: uma abordagem para melhorar a solubilidade**

Eloize Silva Alves,<sup>a</sup> Cintia Stefhany Ripke Ferreira,<sup>b</sup> Paulo Ricardo Souza,<sup>b</sup> Andressa  
Rafaella Silva Bruni,<sup>a</sup> Matheus Campos Castro,<sup>b</sup> Bruno Henrique Figueiredo Saqueti,<sup>a</sup> Oscar  
Oliveira Santos,<sup>a,b</sup> Grasielle Scaramal Madrona,<sup>a</sup> Jesuí Vergílio Visentainer<sup>a,b\*</sup>

*<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá,  
Maringá, PR 87020-900, Brasil*

*<sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR 87020-900,  
Brasil*

**\*Jesuí Vergílio Visentainer, PhD**

E-mail: [jesuivv@gmail.com](mailto:jesuivv@gmail.com)

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3412-897X>

## **Resumo**

O leite humano é essencial para a alimentação de recém-nascidos, mas sua baixa estabilidade ao armazenamento é um fator limitante para que a microencapsulação possa estabilizar e proteger compostos sensíveis à degradação. Este estudo investigou a ação da maltodextrina e da goma arábica sobre o leite humano liofilizado quanto à sua qualidade e solubilidade. A microencapsulação foi evidenciada pela morfologia, e todas as amostras apresentaram alta eficiência de encapsulação (> 85%), demonstrando ser um processo eficiente. Além disso, sinais específicos nos espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier-Transform Infrared*) indicam as interações entre os materiais de revestimento e a matriz leite humano. A goma arábica melhorou as propriedades de reconstituição do leite humano liofilizado (maior solubilidade, 3% em média, e menor tempo de dissolução, em torno de 80%), elucidando sua alta capacidade de estabilização, mesmo em baixas concentrações (5 e 10%). Apesar dos melhores resultados alcançados pela goma arábica, a adição de maltodextrina se mostrou eficaz; ou seja, sua baixa capacidade de estabilização permite combinações com a goma arábica. Também foi observada uma menor polidispersibilidade (diferença de 20% entre amostras: controle e contendo goma arábica), o que significa que as amostras encapsuladas foram mais homogêneas. Portanto, através das análises realizadas, recomendamos o uso de goma arábica individual ou com maltodextrina para obter microcápsulas de leite humano com boa qualidade de reconstituição.

**Palavras-chave:** Liofilização; Estabilidade; Estabilização; Materiais encapsulantes.

## 1. Introdução

Segundo recomendações da Academia Americana de Pediatria, o leite humano deve ser a única fonte de nutrição durante os seis primeiros meses de vida da criança. No entanto, algumas dificuldades, como hospitalização neonatal, morte materna ou hipogalactia (baixa produção de leite humano, podem ser encontradas). Aliado a esse fato, e considerando que o número de doações varia ao longo dos meses, os bancos de leite humano enfrentam um desafio principalmente no controle de qualidade e manutenção do prazo de validade desse produto. Tal fato ressalta, portanto, o grande interesse em avaliar opções de processamento para esse alimento tão necessário, especificamente o leite humano cru e maduro, que os bancos de leite humano descartam devido à sujeira, como cabelos e cílios [1].

A microencapsulação é uma técnica muito utilizada em alimentos para estabilizar e proteger compostos sensíveis à degradação, como ácidos graxos poliinsaturados [2], probióticos [3], e compostos voláteis e bioativos [4]. Todos esses nutrientes estão presentes no leite humano e são essenciais para a alimentação de recém-nascidos e lactentes [1], o que torna o leite humano uma excelente matriz para encapsulação. Além disso, a aplicação da microencapsulação forma um ambiente protetor capaz de aumentar a estabilidade, assim ingredientes estáveis são incorporados em uma matriz transportadora, aprisionando ou revestindo os compostos com agentes ativos (material de parede) e protegendo-os de reações externas [5].

A técnica de liofilização pode promover a preservação do leite humano [6]. Além disso, ao proporcionar a remoção de água por secagem, o processo de encapsulação pode ser possível através da agregação de materiais de parede na matriz formada após a remoção da água obtida por secagem [7]. Além de ser um método de conservação para secagem do leite humano, conforme descrito pela legislação do maior banco de leite humano do mundo [8], a operação do processo é realizada em baixas temperaturas e alto vácuo, preservando

compostos termicamente sensíveis propensos à oxidação [7]. Devido a esses atributos, Oliveira et al. [9] propuseram a possibilidade de reconstituir leite humano liofilizado em volumes capazes de suprir as necessidades nutricionais de recém-nascidos prematuros, permitindo diferentes concentrações de nutrientes. No entanto, um meio que desvaloriza este processamento foi mencionado por Martysiak-Żurowska et al. [6], que para obter um leite humano liofilizado de melhor qualidade, ele deve ser mantido sob refrigeração.

Para minimizar o impacto da exposição, a goma arábica e a maltodextrina podem ser viáveis para microencapsulação de leite humano porque são aditivos seguros em alimentos complementares para lactentes e crianças pequenas. A goma arábica foi aprovada pela FAO/Codex Alimentarius [10], enquanto a maltodextrina foi aprovada pela União Europeia [11] e Resolução RDC nº 44/2011 [12].

A maltodextrina é um polissacarídeo muito utilizado em fórmulas infantis não alergênicas. Além das propriedades oferecidas, é fonte de carboidratos digestíveis que auxiliam no desconforto intestinal, reduzem a carga osmótica e não causam efeitos adversos no crescimento infantil [13]. A goma arábica, por outro lado, é descrita por Wang et al. [14] como um suplemento potencial para fórmulas infantis devido à sua estabilidade de oxidação. Em concordância, Patel e Goyal [4] apontaram a função como material de parede durante a microencapsulação. Além disso, estudos clínicos apontam este agente como um adjuvante no tratamento da inflamação da mucosa intestinal, insuficiência renal crônica e funcionalidade da saúde gastrointestinal adulta. Além disso, a goma arábica proporciona saciedade e efeitos antiobesidade como estratégia dietética [15], tornando a matéria-prima mais valiosa.

As evidências apontam que ambos os agentes encapsulantes mencionados apresentam excelentes atributos nas propriedades funcionais e físicas dos produtos microencapsulados [4]. No entanto, embora a maltodextrina tenha sabor e aroma neutros,

ela é barata, tem baixa viscosidade em alta concentração de sólidos e apresenta baixa capacidade de emulsificação. Portanto, pode ser eficaz misturá-la com outros agentes encapsulantes, como a goma arábica [16]. Conseqüentemente, a goma arábica é amplamente utilizada na incorporação de alimentos. Ela tem poder emulsificante, alta solubilidade e baixa viscosidade, o que a torna um adequado material de parede [16]. Entretanto, estudos referentes à aplicação desses encapsulantes em leite humano ainda são escassos, ressaltando aqui o fator inovação da presente pesquisa.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo produzir e avaliar a microencapsulação de leite humano por liofilização (usando maltodextrina e goma arábica como materiais de parede individuais, e uma combinação dos dois) para melhorar as características tecnológicas e a reidratação, bem como uma investigação de interações químicas, morfologia e distribuição de tamanho de partículas foi conduzida.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Reagentes**

Maltodextrina (Sigma Aldrich, Brasil) e goma arábica (Reatec-Reagen, Brasil), ambas puras e em pó foram utilizadas como agentes encapsulantes. Sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) foi utilizado para obter alto teor de umidade na medição da higroscopicidade e brometo de potássio (KBr) na análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, ambos reagentes de alto grau de pureza (Sigma Aldrich, EUA). Para determinar a eficiência de encapsulação, d-lactose monoidratada (pureza  $\geq 99,9\%$ ) foi utilizada como padrão, e ácido fórmico (98%) como formador de íons, ambos adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA), além dos solventes acetonitrila (grau de pureza de cromatografia líquida de alta eficiência) (JT Baker, México) e água Milli-Q<sup>®</sup> filtrada por membrana com tamanho de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, EUA).

## **2.2. Aprovação ética e amostragem**

O Comitê de Ética em Pesquisa local aprovou todos os procedimentos com número de processo 3.430.478. Amostras de leite humano cru, maduro, descartado por sujeira (por exemplo, cabelos, cílios) foram coletadas no Hospital Universitário Regional de Maringá seguindo protocolo específico para bancos de leite humano, sob resfriamento a 4 °C segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária [8], com um total de 10 doadores. Depois, um *pool* de leite humano adquirido foi formado, com um total de cerca de 1000 mL, do qual aproximadamente 100 mL de cada doador foram selecionados. Uma alíquota da amostra foi restrita e usada como leite humano líquido (LHLIQ) para análise de distribuição de partículas sem seguir as outras etapas. Outra amostra foi considerada um controle (CONTROLE), onde foi seguida da medição dos sólidos solúveis usando um refratômetro digital (Hanna Instruments, modelo HI96801), e após, teve seu congelamento como preparação prévia continuada do processamento de liofilização. Esta continha o mesmo volume que as amostras encapsuladas sem usar nenhum material encapsulante.

## **2.3. Obtenção das microcápsulas**

Na encapsulação do leite humano foram utilizadas maltodextrina em pó e goma arábica em pó como agentes carreadores conforme apresentado na Tabela 1. Para isso, foi usada uma proporção de leite humano: agente encapsulante (9:1 p/p), considerando a proporção de 0,5 maltodextrina + 0,5 goma arábica para mistura binária. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por 20 min em agitador magnético (Modelo 761-5, Fisatom, Brasil), conforme metodologia descrita por Damaceno et al. [3]. Ao final deste processo, as amostras submetidas a encapsulação foram etiquetadas de acordo com os componentes utilizados: leite humano + maltodextrina (LHMALT), leite humano + goma

arábica (LHGARA) e leite humano + maltodextrina + goma arábica (LHMARA). As amostras ainda líquidas foram medidas em triplicata quanto aos seus teores de sólidos solúveis usando um refratômetro digital a 25 °C, expresso em °Brix.

**Tabela 1.** Conteúdo dos componentes as microcápsulas de leite humano.

<b>Amostra</b>	<b>Conteúdo</b>	<b>Proporção matriz e encapsulante (p/p)</b>
LHMALT	Leite humano + maltodextrina	9:1
LHGARA	Leite humano + goma arábica	9:1
LHMARA	Leite humano + maltodextrina + goma arábica	9:0,5+0,5

As amostras foram divididas em porções de 120 mL em duplicata, congeladas a -18 °C por 24 h e, em seguida, liofilizadas em um liofilizador (Alpha 1-2 LD Plus, modelo 101.522, Osterode, Alemanha) a cerca de -52 °C e 0,031 mbar. O processo de liofilização levou aproximadamente 48 h. O rendimento foi calculado como a porcentagem de sólidos totais recuperados após a liofilização em relação à massa inicial total do processo.

## **2.4. Caracterização de microcápsulas**

Foram realizadas análises físico-químicas e instrumentais para avaliar a qualidade dos produtos obtidos, as quais estão descritas a seguir:

### **2.4.1 Umidade**

Os teores de umidade dos produtos liofilizados foram determinados usando um analisador de umidade infravermelho (modelo I-Thermo, Bel Engineering, Itália). As medições foram feitas em triplicata a  $102 \pm 1$  °C por  $\pm 3$  min até que um peso constante fosse alcançado. Os valores foram expressos em porcentagens (%).

#### 2.4.2. Atividade de água ( $A_w$ )

A determinação da  $A_w$  dos pós foi realizada em triplicata utilizando o Aqua Lab Modelo Cx2T, operando a uma temperatura de  $25,0 \pm 0,3$  °C.

#### 2.4.3. Higroscopicidade

A avaliação da higroscopicidade foi feita de acordo com o método utilizado por Fritzen-Freire et al. [17], com pequenas modificações. Aproximadamente 1 g de cada amostra foi pesada em placas de Petri (50 × 50 mm) e armazenada a 25 °C em um dessecador preparado previamente com uma solução saturada de Sulfato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Umidade Relativa, 81 %) por sete dias. Ao término, a amostra foi pesada quanto a a higroscopicidade verificada. A umidade higroscópica foi pesada e calculada de acordo com a Eq. (1).

$$\text{Higroscopicidade} = \frac{\Delta_m / (m + m_1)}{1 + (\Delta_{m+m})} \quad (1)$$

Onde:

$\Delta_m$  = massa do pó após atingir o equilíbrio (g);

$m$  = massa inicial do pó (g);

$m_1$  = quantidade de água livre do pó antes da exposição à alta umidade (%).

#### 2.4.4. Dissolução

A dissolução foi realizada seguindo o método utilizado por Fritzen-Freire et al. [17], adicionando 2 g de amostra em pó a 50 mL de água destilada à temperatura ambiente  $25 \pm 2$  °C. A mistura foi agitada em um béquer de 100 mL com agitador magnético (761-5, Fisatom, Brasil) a 890 rpm. O tempo necessário para a dissolução completa do material foi registrado. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

#### 2.4.5. Índice de solubilidade

A solubilidade dos pós foi determinada seguindo o método relatado por Ho et al. [18], com modificações. Soluções aquosas (5% p/p) da amostra em pó foram misturadas em água destilada usando um agitador magnético a 400 rpm (761-5, Fisatom, Brasil) por 30 min. Em seguida, a solução foi centrifugada a 2500 rpm (Harrier 18/80, Triad Scientific, Japão) por 15 min a 20 °C. Todos os sobrenadantes e gordura foram removidos. Os sólidos insolúveis foram lavados com água destilada e transferidos para cadinhos previamente pesados. Em seguida, foi seco em uma estufa a 105 °C até peso constante e pesado após resfriamento em um dessecador. A solubilidade (%) foi calculada usando a seguinte equação (Eq. (2)).

$$\begin{aligned} \text{Solubilidade (\%)} \\ = \frac{\text{Massa sólidos totais} - \text{Massa de sólidos insolúveis}}{\text{Massa de sólidos totais}} \times 100 \quad (2) \end{aligned}$$

#### 2.4.6. Cor instrumental

A cor foi analisada com o colorímetro digital o Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Osaka, Japão). A escala de cores CIELab foi usada para medir os parâmetros L\*, a\* e b\*. Na escala de cores CIELab, o parâmetro L\* varia de 0 a 100, indicando a variação da cor do preto para o branco; o eixo a\* mostra a variação do vermelho (+a\*) para o verde (-a\*), enquanto b\* mostra do amarelo (+b\*) para o azul (-b\*). A diferença total de cor ( $\Delta E$ , Eq. (3)), Índice de Brancura ( $W_i$ , Eq. (4)) e Índice de Amarelecimento ( $Y_i$ , Eq. (5)) foram calculados usando as seguintes equações de Pathare *et al.* [19].

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

$$W_i = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (4)$$

$$Y_i = \frac{142.6 b^*}{L^*} \quad (5)$$

onde:

$\Delta L^*$  é a diferença de brilho;

$\Delta a^*$  é a intensidade da cor vermelha;

$\Delta b^*$  é a intensidade da cor amarela entre as amostras.

## 2.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Para determinar se houve alterações químicas, a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier-Transform Infrared*) (modelo Nicolet iN10, Thermo Fisher Scientific, Brasil) foi usada para analisar os agentes encapsulantes: maltodextrina e goma arábica, além das amostras liofilizadas e comparar seus espectros. Todas as amostras avaliadas foram misturadas com brometo de potássio seco em pó (KBr) na proporção de 1:100 (p/p). Os espectros de FTIR foram registrados com uma resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  dentro da faixa de número de onda de  $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ . A análise foi realizada em triplicata, e o processamento do sinal e as imagens dos espectros foram obtidos usando OriginPro para derivar as áreas dos picos.

## 2.6. Morfologia do pó (microscopia eletrônica de varredura)

As amostras foram previamente preparadas em fita de carbono e metalizadas no *stub* com uma fina camada de ouro ( $\approx 50 \text{ nm}$ ) em um metalizador (modelo SCD 050, Bal-Tec, Suíça). Após o processo de metalização, as amostras foram avaliadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura modelo Quanta 250 (Fisher Scientific FEI, República Tcheca), com ampliação de  $2000\times$  e voltagem de aceleração de  $20 \text{ kV}$ .

## 2.7. Distribuição hidrodinâmica do tamanho das partículas e polidispersibilidade

As distribuições de tamanho de partículas da matriz leite humano líquido (LHLIQ) e das amostras liofilizadas foram medidas em triplicata usando um analisador de tamanho de partículas de espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *dynamic light scattering*) com um feixe de laser a 663 nm em um sistema computadorizado Litesizer 500 (Anton Paar, EUA), e as medições do índice de polidispersibilidade também foram realizadas. As amostras foram diluídas com água destilada na proporção de 100:3000 (p/p), e sonicadas (ELMA, Elmasonic P, Brasil) a 41 kHz por 5 min.

## 2.8. Determinação da eficiência de encapsulação

A quantificação da lactose obteve a determinação da eficiência de encapsulação. As amostras foram avaliadas utilizando o método proposto por Chiavelli et al. [20], com modificações, através da aplicação de uma fonte de ionização em tandem de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com um espectrômetro de massas (UHPLC-ESI-MS/MS, do inglês *ultra-high-performance liquid chromatography-tandem ionization source with a mass spectrometer*). Para isso, foi realizada uma curva de calibração da d-lactose (5,0–100,0 mg mL<sup>-1</sup>) em acetonitrila:água (7:3 v/v), criada a partir da diluição de uma solução estoque de d-lactose (1000 mg L<sup>-1</sup>) preparada em acetonitrila:água (7:3 v/v). Uma equação de regressão foi obtida a partir da curva padrão e posteriormente usada para determinar as concentrações de lactose das amostras.

As análises foram realizadas utilizando uma coluna ACQUITY UPLC<sup>®</sup> Bridged Ethylene Hybrid (BEH) C18 (comprimento 50 mm × diâmetro interno 2,1 mm, tamanho da partícula 1,7 µm) adquirida da Waters (Milford, EUA), em um sistema ACQUITY UPLC<sup>®</sup> classe H (Milford, EUA) em tandem com espectrômetro de massas triplo quadrupolo Xevo TQD<sup>™</sup> (Milford, EUA), equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI)

Waters Z spray™ (Milford, EUA). Como fase móvel, a água ultrapura Milli-Q® foi acidificada com ácido fórmico 0,1% (30%, eluente A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (70%, eluente B). Todas as amostras foram acidificadas com 0,1% de ácido fórmico para favorecer a formação de íons. A eluição foi realizada em modo isocrático a uma vazão de 0,15 mL min<sup>-1</sup> com ajuste de volume de injeção de 1,5 µL, e o tempo total de execução cromatográfica foi de 6,0 min. O MS foi ajustado para ionização por eletrospray positiva (ESI+) com os seguintes parâmetros: tensão capilar de 3,0 kV; tensão de cone de 17 V e tensão de extrator de 3,0 V. A temperatura da fonte foi de 70 °C e a temperatura do gás de dessolvatação foi de 500 °C. O nitrogênio utilizado no equipamento foi obtido por um gerador de nitrogênio (Peak Scientific®, modelo NM32LA, Escócia), com fluxos de gás de cone de 50 L h<sup>-1</sup> e gás de dessolvatação de 500 L h<sup>-1</sup>. Para o processo de fragmentação no modo scan MS/MS, gás argônio de pureza 99,999 % (White Martins, Brasil) foi usado como gás de colisão a uma pressão de 15.000 psi. Para aquisição e processamento de dados, foi utilizado o software MassLynx™ versão 4.1 Waters (Milford, EUA).

Os resultados da regressão linear realizada através da relação da área do pico cromatográfico versus as concentrações de d-lactose, e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), obteve linearidade adequada com  $r^2 = 0,9946$ . A equação de regressão obtida a partir da curva padrão ( $n = 5$ ) contendo cinco repetições para cada ponto foi  $y = 826.6 x + 1291.8$ , que foi utilizado para calcular as concentrações de lactose das amostras avaliadas. Após determinar as concentrações de lactose, a eficiência de encapsulação foi obtida pela Eq. (6).

*Eficiência de encapsulação (%)*

$$= \frac{(\text{Concentração de lactose}_{\text{Controle}} - \text{Concentração de lactose}_{\text{Encapsulado}})}{\text{Concentração de lactose}_{\text{Controle}}} \times 100 \quad (6)$$

## 2.9. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de *Tukey* para comparação de médias ( $p < 0,05$ ). Os dados foram analisados pelo *software* Statistic 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

## 3. Resultados e discussão

### 3.1. Caracterização dos pós obtidos

Neste estudo, o rendimento após a liofilização obteve valores de 11,89% para a amostra CONTROLE, 20,23% para LHMALT, 19,85% para LHGARA e 19,86% para LHMARA. Nota-se que o rendimento aumentou consideravelmente (em média 40%) pela incorporação de agentes encapsulantes. Rezvankhah et al. [7] menciona que o processo de encapsulação por liofilização é ideal para rendimento e recuperação.

Em relação à avaliação tecnológica das amostras liofilizadas (Tabela 2), as características nos pós (leite humano liofilizado e microcápsulas) podem ser identificadas pela análise de sólidos solúveis, umidade, atividade de água, higroscopicidade, dissolução e solubilidade. Em relação ao teor de sólidos solúveis, observou-se que as microcápsulas não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), mas o CONTROLE foi diferente, apresentando menor valor (9,13°Brix).

**Tabela 2.** Avaliação tecnológica de pó de leite humano liofilizado e microcápsulas.

Amostras	Sólidos solúveis (°Brix)	Umidade (%)	Atividade de água (Aw)	Higroscopicidade (%)	Dissolução (s)	Solubilidade (%)
CONTROLE	9,13±0,23 <sup>b</sup>	4,75±0,04 <sup>a</sup>	0,3921±0,0210 <sup>a</sup>	9,44±0,02 <sup>a</sup>	275,41±9,64 <sup>a</sup>	94,67±0,12 <sup>d</sup>
LHMALT	17,57±0,15 <sup>a</sup>	4,05±0,09 <sup>b</sup>	0,2515±0,0071 <sup>b</sup>	8,68±0,13 <sup>a</sup>	154,68±2,56 <sup>b</sup>	95,56±0,89 <sup>c</sup>
LHGARA	17,43±0,12 <sup>a</sup>	2,82±0,02 <sup>c</sup>	0,1474±0,0139 <sup>c</sup>	8,33±0,30 <sup>a</sup>	55,05±15,44 <sup>d</sup>	98,29±0,36 <sup>a</sup>
LHMARA	17,77±0,32 <sup>a</sup>	3,81±0,15 <sup>b</sup>	0,1663±0,0081 <sup>c</sup>	8,92±0,46 <sup>a</sup>	102,72±12,98 <sup>c</sup>	96,20±0,19 <sup>b</sup>

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de triplicata. Valores com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de *Tukey*. Amostras: CONTROLE: Leite humano liofilizado; LHMALT: Leite humano:Maltodextrina (9:1); LHGARA: Leite humano:Goma arábica (9:1); LHMARA: Leite humano:Maltodextrina:Goma arábica (9:0,5:0,5).

Os valores de umidade encontrados neste estudo variaram de 2,82 a 4,75%. A qualidade do liofilizado está intimamente relacionada ao seu teor de umidade, em que altos níveis são favoráveis à oxidação, às reações enzimáticas, ao crescimento microbológico, à formação de lactose amorfa, à modificação da morfologia das partículas e ao comprometimento da solubilidade [6]. Dentre as amostras microencapsuladas, observou-se que a adição de encapsulantes reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o teor de umidade, sendo o menor valor obtido para a formulação LHGARA ( $2,82 \pm 0,02$ ).

Os valores de  $A_w$  estão intimamente ligados à umidade, fator importante que afeta a estabilidade do produto por impedir a disponibilidade de reações e deterioração, sendo assim, valores menores são preferidos devido ao maior prazo de validade. Neste caso, as amostras LHGARA e LHMARA apresentaram os menores valores de  $A_w$ ,  $0,1474 \pm 0,0139$  e  $0,1663 \pm 0,0081$ , respectivamente, sem diferenças significativas entre elas ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, o maior valor observado foi para a amostra CONTROLE ( $0,3921 \pm 0,0210$ ), indicando que os agentes encapsulantes atuam positivamente na estabilidade do produto, conforme apontado por Cortés-Morales et al. [5]. Produtos secos, como fórmulas infantis, foram mencionados por Winbreck et al. [23], contendo baixa atividade de água ( $A_w < 0,25$ ) e apresentando uma proposta de encapsulação para otimizar sua ação probiótica. Os achados do presente estudo indicam que as amostras LHGARA, LHMARA e LHMALT apresentam baixo teor de  $A_w$ , indicando que podem ser produtos promissores para o consumo infantil.

Uma baixa higroscopicidade indica que os produtos em pó estão adequados [21]. Não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos ( $p > 0,05$ ), além de serem considerados baixos ( $8,33 \pm 0,30$  a  $9,44 \pm 0,02$ ) quando comparados aos dados de Thakur et al. [21], que considerou que um resultado satisfatório é igual/>>18,96% para um produto similar (leite em pó microencapsulado).

O tamanho da partícula afeta diretamente a higroscopicidade, pois a absorção de umidade ocorre principalmente na superfície da partícula. Uma baixa higroscopicidade é necessária para fornecer estabilidade microbiológica e química durante o armazenamento do produto em pó [21]. Este fenômeno, sempre que ocorre, promove a agregação do pó e conseqüentemente dificulta a reconstituição. Manifesta-se devido aos altos níveis de umidade e atividade de água ( $A_w$ ) e provavelmente devido à migração de gordura do interior da matriz para a superfície [22]. Os resultados sugerem que o tamanho das partículas liofilizadas teve uma influência mínima na higroscopicidade.

Em relação ao poder de dissolução, os achados mencionados neste estudo concordam com Karrar et al. [16], comprovando a alta solubilidade da goma arábica quando encapsulada em leite humano. Este fato está intimamente relacionado ao seu poder emulsificante, que, quando presente, foi facilmente e rapidamente dissolvido, resultando em um valor de  $55,05 \pm 15,44$  s (LHGARA), destacando que este foi, em média, cinco vezes menor que para a amostra de CONTROLE ( $275,41 \pm 9,64$  s). Neste contexto, produtos em pó com propriedades de rápida dissolução são desejáveis e provavelmente de melhor qualidade.

Efeitos que configuram a capacidade de reconstituição são consequência das implicações durante a secagem e podem ser justificados, pois pode ocorrer a formação de lactose amorfa, além do espalhamento de gordura na superfície do leite em pó, formando interações hidrofóbicas entre a água e a matriz leite humano. Esse processo também causa a transformação de fase da lactose, que pode interagir com a estrutura da proteína por meio de ligações de hidrogênio [18]. Essa evidência prejudica a solubilidade do leite humano, conforme observado na dissolução do CONTROLE.

A solubilidade do pó investigada pode estar relacionada à dispersibilidade das partículas, destacando a qualidade do material da parede do pó encapsulado [24]. Diante

dos resultados fornecidos pela microencapsulação, houve o aumento na solubilidade do leite humano liofilizado, sendo que a amostra CONTROLE apresentou a menor solubilidade. Dentre os encapsulantes, a goma arábica possui íons cálcio [4] e poder quelante quando ligado às proteínas do leite humano [25]. Quando adicionado em LHGARA apresentou a melhor dissolução e solubilidade ( $98,29 \pm 0,36$  %). Quando utilizado na mistura binária (LHMARA), também apresentou melhor resultado de solubilidade ( $96,20 \pm 0,19$  %). Entretanto, a justificativa para a diminuição da solubilidade entre essas amostras se deve à presença de maltodextrina e sua deficiência na emulsificação do leite humano [16]. O resultado é comprovado ao avaliar a solubilidade na amostra LHMALT ( $95,56 \pm 0,89$  %). Ainda, observou-se entre os resultados um aumento no potencial de solubilidade, sendo uma propriedade de grande importância na reconstituição do pó, o que possivelmente foi proporcionado pela encapsulação do leite humano liofilizado, pois a amostra CONTROLE obteve o menor teor de  $94,67 \pm 0,12$ . Segundo Masum et al. [26], a solubilidade em água dos produtos em pó é influenciada pela composição da sua superfície, podendo ser afetada pelo processo de encapsulação.

As alterações na coloração das amostras avaliadas (Tabela 3) apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E$ , WI e  $Y_i$ .

**Tabela 3.** Análise instrumental de cor de amostras liofilizadas.

Amostras	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$	WI	$Y_i$
<b>CONTROLE</b>	$90,22 \pm 0,14^c$	$-3,07 \pm 0,01^c$	$19,41 \pm 0,12^a$	-	$78,05 \pm 0,05^d$	$30,67 \pm 0,15^a$
<b>LHMALT</b>	$93,10 \pm 0,74^a$	$-1,53 \pm 0,02^b$	$10,41 \pm 0,07^d$	$9,59 \pm 0,23$	$87,41 \pm 0,41^a$	$15,94 \pm 0,17^d$
<b>LHGARA</b>	$91,80 \pm 0,03^b$	$-1,62 \pm 0,01^b$	$13,71 \pm 0,08^c$	$6,09 \pm 0,08$	$83,94 \pm 0,08^b$	$21,30 \pm 0,13^c$
<b>LHMARA</b>	$90,68 \pm 0,15^c$	$-1,34 \pm 0,09^a$	$16,37 \pm 0,19^b$	$3,53 \pm 0,18$	$81,12 \pm 0,09^c$	$25,74 \pm 0,25^b$

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicata. Valores com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Amostras: CONTROLE: Leite humano liofilizado; LHMALT: Leite humano:Maltodextrina (9:1); LHGARA: Leite humano:Goma arábica (9:1); LHMARA: Leite humano:Maltodextrina:Goma arábica (9:0,5:0,5).

A medição de  $L^*$  (luminosidade) esclarece a afirmação de Rezvankhah et al. [7] em que pós mais claros são obtidos à medida que maltodextrina e/ou goma arábica são adicionadas. Esta consideração foi alcançada ao comparar os presentes dados, uma vez que o menor valor obtido foi para o CONTROLE ( $90,22 \pm 0,14$ ), provavelmente justificado pela coloração característica do leite humano, que resulta em uma aparência branca devido à dispersão de luz das micelas de caseína e da membrana do glóbulo de gordura [25].

Além disso, é relatado que o menor valor  $a^*$  encontrado foi para a amostra CONTROLE ( $-3,07 \pm 0,01$ ). Este valor, que tende a ser verde, pode ser devido à ingestão de multivitamínicos e minerais (principalmente ferro) [25]. Além disso, os resultados mostram que a incorporação de um encapsulante aumenta tendência a vermelhidão, obtendo seu maior valor para a formulação mista LHMARA ( $-1,34 \pm 0,09$ ). Quanto ao uso de encapsulantes individuais, não houve diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ).

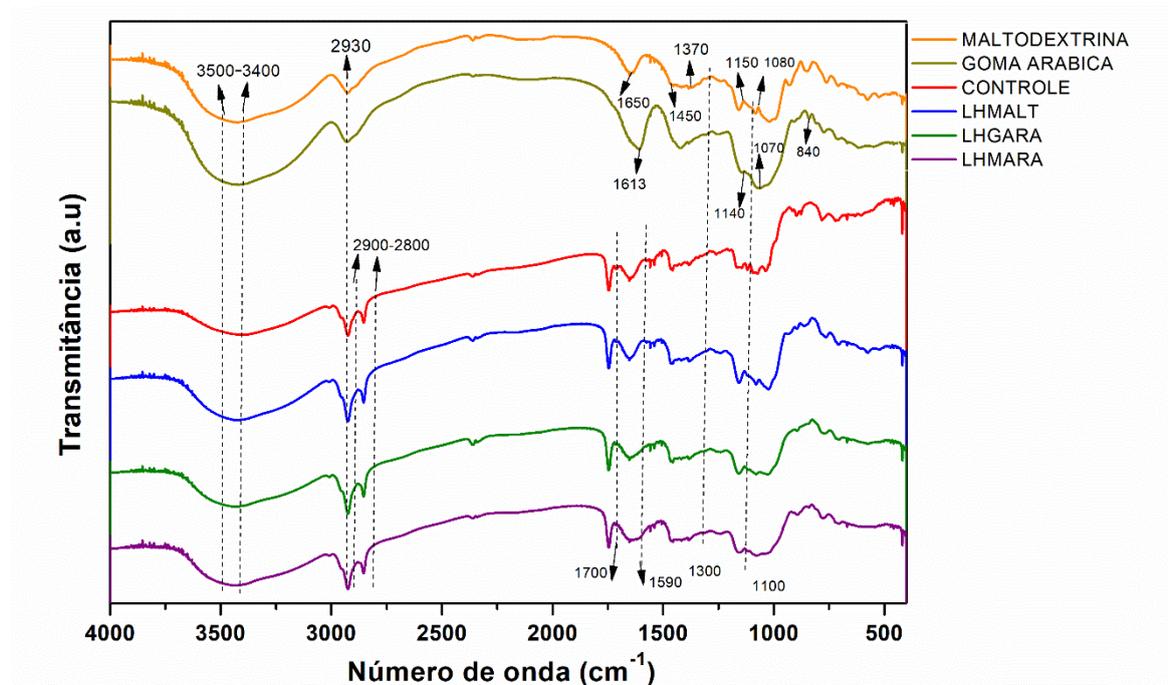
Sarabandi et al. [27] afirmam que um  $b^*$  (amarelamento) maior é obtido quando se adiciona goma arábica em vez de maltodextrina. Essa tendência pode estar relacionada à cor branca característica da maltodextrina. Em geral, quando a goma arábica foi utilizada de forma mista ou isolada, condicionou a proximidade com a amostra CONTROLE, que apresentou um valor de  $b^*$  de  $19,41 \pm 0,12$ , o maior entre as amostras. Essa situação pode explicar o fato do leite humano assumir cores relacionadas à ingestão alimentar da lactante, neste caso, possivelmente dietas ricas em carotenoides [25].

Os valores de  $\Delta E$ , que correspondem ao índice de diferença perceptível entre duas cores, são classificados como muito distintos ( $\Delta E > 3$ ), distintos ( $1,5 < \Delta E < 3$ ) e pouco distintos ( $1,5 < \Delta E$ ) [19]. Ou seja, em termos de identificação, todas as amostras foram muito diferentes do CONTROLE, mas dentre os valores apresentados, apenas a amostra LHMARA ( $3,53 \pm 0,18$ ) que menos teve distinção da CONTROLE.

Os índices de WI e Yi correlacionam-se com as preferências do consumidor pelas cores branca e amarela, respectivamente [19]. WI comprova os resultados esperados de maior claridade em LHMALT ( $87,41 \pm 0,41$ ) através do uso de maltodextrina. Por outro lado, Yi demonstrou a relação das atividades biológicas originárias do leite humano, provavelmente devido às vitaminas lipossolúveis com pigmentos, como o  $\beta$ -caroteno. Este fato também está relacionado à composição da gordura e das proteínas do leite humano [28], que influenciam os parâmetros de  $L^*$  e  $b^*$ .

### 3.2. Definição de grupos funcionais por FTIR

Os espectros do CONTROLE, amostras encapsuladas e seus agentes de parede, maltodextrina e goma arábica, são mostrados na Figura 1. Esses espectros foram verificados para identificar os grupos funcionais de cada amostra, descrevendo possíveis interações entre os materiais de revestimento e a matriz leite humano.



**Fig. 1.** Espectros FTIR. Amostras: MALTODEXTRINA (—); GOMA ARÁBICA (—); CONTROLE: Leite humano liofilizado (—); LHMALT: Leite humano:Maltodextrina (9:1) (—); LHGARA: Leite Humano: Goma arábica (9:1) (—); LHMARA: Leite humano:Maltodextrina:Goma arábica (9:0,5:0,5) (—).

Observou-se banda larga entre 3400 e 3500  $\text{cm}^{-1}$  e vibração de baixa intensidade próxima a 2930  $\text{cm}^{-1}$  em ambos os compostos usados como encapsulantes e, conseqüentemente, essas bandas também foram visualizadas nos espectros de leite humano microencapsulado. Mansour et al. [29] encontraram essas bandas nos espectros de goma arábica e extrato de antocianina vermelha microencapsulados com goma arábica e atribuíram a presença de grupos hidroxila e carboxila livres, respectivamente, característicos desses polissacarídeos. Esse fenômeno também foi relatado por Kang et al. [30] em espectros de microcápsulas de goma arábica, maltodextrina e clorofila com tais compostos como materiais de parede. Vale ressaltar que os picos de hidroxila reduziram consideravelmente a intensidade nas microcápsulas em comparação aos picos de goma arábica e maltodextrina, o que implica que os grupos  $-\text{OH}$  dos polissacarídeos participaram de reações químicas durante a secagem por liofilização, com ligações de hidrogênio e/ou esterificação entre maltodextrina e goma arábica [30].

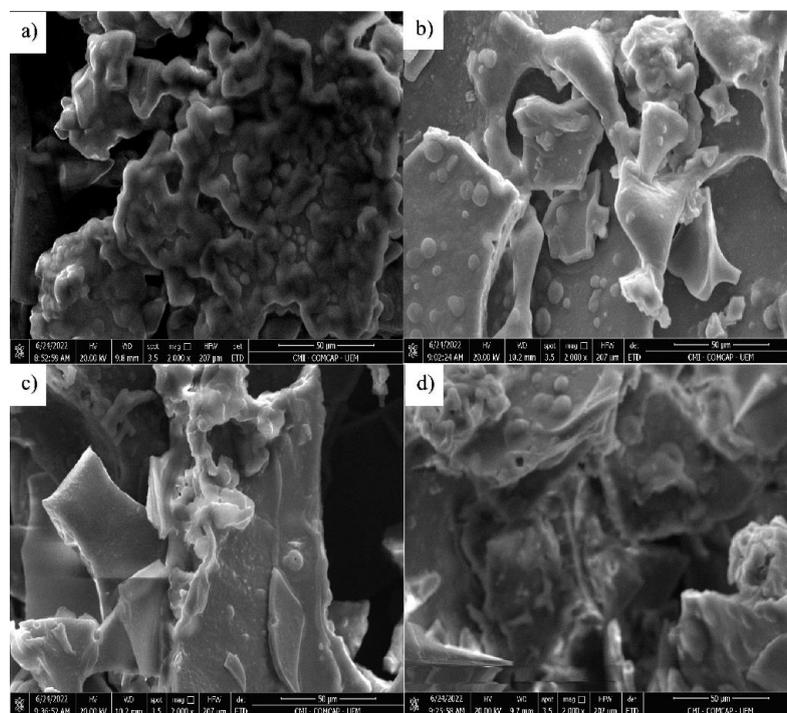
Além disso, bandas próximas a 1613, 1450, 1370, 1150 e 1080  $\text{cm}^{-1}$  foram identificadas no espectro da maltodextrina, semelhante aos estudos de Kang et al. [30] e Krishnaiah et al. [31] e atribuído ao alongamento de  $\text{C}=\text{O}$ , flexão de  $-\text{CH}_2$ , flexão de  $\text{OH}$  e alongamento de  $\text{C}-\text{O}$ , respectivamente. Enquanto na goma arábica, absorções próximas a 1650  $\text{cm}^{-1}$  também são encontradas, referindo-se ao alongamento do  $\text{C}=\text{O}$  e flexão de  $\text{NH}$ , em 1140 e 1070  $\text{cm}^{-1}$  associadas à flexão do  $\text{C}-\text{O}$ , e em 840  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas às vibrações de deformação de  $\text{OH}$  [30].

No espectro de leite humano, as vibrações típicas entre 2800 e 2900  $\text{cm}^{-1}$  referem-se ao estiramento de  $\text{C}-\text{H}$  dos ácidos graxos do leite humano. Entre 1700 e 1590  $\text{cm}^{-1}$ , as bandas visualizadas referem-se à amida I da proteína do leite humano e representam 80% das absorções de estiramento da  $\text{C}=\text{O}$ , enquanto as absorções entre 1300 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  referem-se às ligações  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ , características de polissacarídeos como agentes

encapsulantes [24], e também do dissacarídeo do leite humano, a lactose [32, 33]. De acordo com Karaaslan et al. [24], é identificado em 1651–1641  $\text{cm}^{-1}$ , o alongamento do C=O do grupo da amida I, e em torno de 1750–1740  $\text{cm}^{-1}$  grupos éster carbonílicos de triacilglicerol foram encontrados. Esses compostos estão presentes nas amostras CONTROLE e encapsuladas, respectivamente. Portanto, os compostos expostos representam uma impressão digital molecular dos materiais revestidos. Como todas essas vibrações presentes no espectro também estavam presentes nas imagens de leite humano microencapsuladas, pode ser viável e comprovado sua microencapsulação.

### 3.3. Morfologia por SEM e distribuição de tamanho de partículas

Os efeitos das condições de liofilização no processo de microencapsulação de leite humano com diferentes materiais de parede são demonstrados na Fig. 2.



**Fig. 2.** Micrografias das amostras liofilizada. (a) CONTROLE: Leite humano liofilizado; (b) LHMALT: Leite humano:Maltodextrina (9:1); (c) LHGARA: Leite humano:Goma arábica (9:1); (d) LHMARA: Leite humano:Maltodextrina:Goma arábica (9:0,5:0,5).

Conforme visto na Fig. 2, o processo de encapsulação resultou em uma estrutura semelhante a vidros quebrados de tamanhos diversificados, característica de cápsulas liofilizadas [7]. Além desta aparência, a grande maioria das partículas não apresentou indícios de trincas em suas superfícies, o que é de grande importância para garantir a proteção do leite humano.

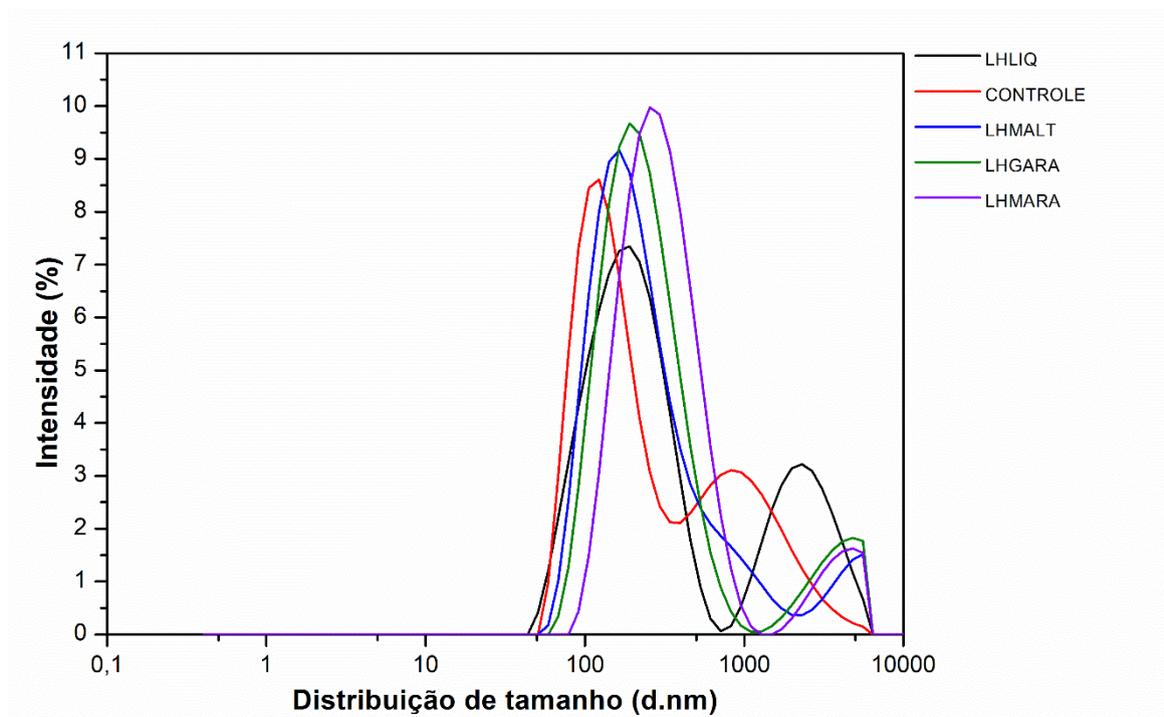
Entretanto, de acordo com as micrografias apresentadas pelo MEV, o processo de encapsulação causou uma alteração considerável na morfologia da amostra CONTROLE. Na micrografia da amostra CONTROLE (Fig. 2a), agregações de partículas foram capturadas. Quando adicionados, os agentes encapsulantes evidenciados pela Fig. 2b, 2c e 2d obtiveram uma redução nessa característica de agregação do leite humano liofilizado, apresentando aparência escamosa e rugas, demonstrando a eficiência do material de parede, contribuindo para melhor solubilidade dos componentes no leite humano e fornecendo evidências de que o processo de microencapsulação pode ser útil para a produção de microcápsulas de leite humano estáveis.

Os agentes encapsulantes apresentam vantagens sobre o fenômeno higroscópico. Se for alto, é responsável por agregar partículas no pó, dificultando assim a reconstituição. As formulações melhoradas podem promover a formação de camadas capazes de proteger as gotículas de gordura que migraram do interior da matriz para a superfície quando aplicadas no processo de secagem. Assim, o microencapsulamento atua como uma barreira protetora para a matriz [22].

A Fig. 2b mostrou agregações visivelmente menores do que na Fig. 2a. Considerando que a maltodextrina provavelmente apresenta menor atividade superficial, recomenda-se seu uso em misturas binárias com propriedades emulsificantes superiores, como com a goma arábica [16], fato explicado em Fig. 2d.

Além de melhorar a mistura binária, os resultados da Fig. 2c indicam que as microcápsulas desejadas foram obtidas sob as condições ótimas de adição de goma arábica, o que se mostrou eficaz para aprisionar os componentes do leite humano.

Outro parâmetro relevante é explicado pela distribuição do tamanho das partículas, que afeta diretamente a solubilidade, a aparência e a dispersibilidade [22]. As distribuições de tamanho de partículas da matriz liofilizada e da matriz leite humano foram avaliadas e estão disponíveis na Fig. 3. Os resultados foram representados em intensidade (%) ocupada pela distribuição de tamanho de partícula (nm).



**Fig. 3.** Distribuição do tamanho das partículas (nm) em relação à intensidade (%). Amostras LHLIQ: Leite humano líquido (—); CONTROLE: Leite humano liofilizado (—); LHMALT: Leite humano:Maltodextrina (9:1) (—); LHGARA: Leite Humano: Goma arábica (9:1) (—); LHMARA: Leite humano:Maltodextrina:Goma arábica (9:0,5:0,5) (—).

Considerando o processo de reidratação em duas etapas, conforme descrito por Rezvankhah et al. [7], as diferentes morfologias das partículas explicam os resultados sob reidratação alcançados neste estudo. A distribuição do tamanho das partículas foi verificada para entender o processo de reidratação das amostras.

Conseqüentemente, quando comparados os dados relatados por Torres et al. [34] com a Fig. 3, foi identificado uma micela de caseína centrada na faixa do grupo formado entre 150 e 200 nm. Este resultado foi verificado nas amostras LHLIQ (200,0 nm) e CONTROLE (155,6 nm), nas quais esta proteína foi encontrada livre sem que nenhum processo tenha sido aplicado; assim, ambos os resultados podem ser relacionados.

Por outro lado, um tamanho de partícula maior favorece uma emulsão mais estável [7, 16]. Assim conforme observado com a adição de encapsulantes, que exibiram valores de 305,5, 246,9 e 319,1 nm entre as amostras LHMALT, LHGARA e LHMARA, respectivamente. Além disso, as discrepâncias podem ser justificadas pelo uso de diferentes materiais encapsulantes. Rezvankhah et al. [7] relatam que o aumento do tamanho das partículas apresenta espaços interpartículas na superfície que facilitam a interação com a água.

A Fig. 3 elucidada ainda mais o pico correspondente da maior porção, representada por um diâmetro médio de partícula de cerca de 281,4 nm, associado a LHMARA. Na devida ordem, os outros foram determinados como 215,0, 181,7, 200,6 e 220,4 nm para as amostras LHLIQ, CONTROLE, LHMALT e LHGARA.

Pan et al. [35] investigaram o tamanho do glóbulo de gordura leite humano, e o padrão de distribuição foi uma formação em 700 nm e 5000 nm. Em contraste, nosso estudo atual determinou que os glóbulos de gordura estavam entre 1208 nm (LHLIQ), 2519 nm (CONTROLE), 3754 nm (LHGARA), 3925 nm (LHMARA) e 4219 nm (LHMALT).

A distribuição do tamanho de partícula determinada pode ser relacionada ao efeito da encapsulação, material de revestimento e condições de secagem. Outra influência da encapsulação afetou o tamanho de partícula, aparência, fluidez e dispersibilidade dos pós [22]. Todos os encapsulantes aderiram ao leite humano, formando uma matriz encapsulada.

O índice de polidispersibilidade (Pdi) foi investigado e é demonstrado na Tabela 4. O índice de polidispersibilidade está relacionado à distribuição do tamanho das partículas; valores baixos indicam uma distribuição mais homogênea. Os valores de polidispersibilidade obtidos nas amostras encapsuladas foram 0,377, 0,345 e 0,294 para LHMALT, LHGARA e LHMARA, respectivamente. Enquanto isso, LHLIQ (0,468) e CONTROLE (0,398) apresentaram menor homogeneidade.

**Tabela 4.** Avaliação da homogeneidade das partículas.

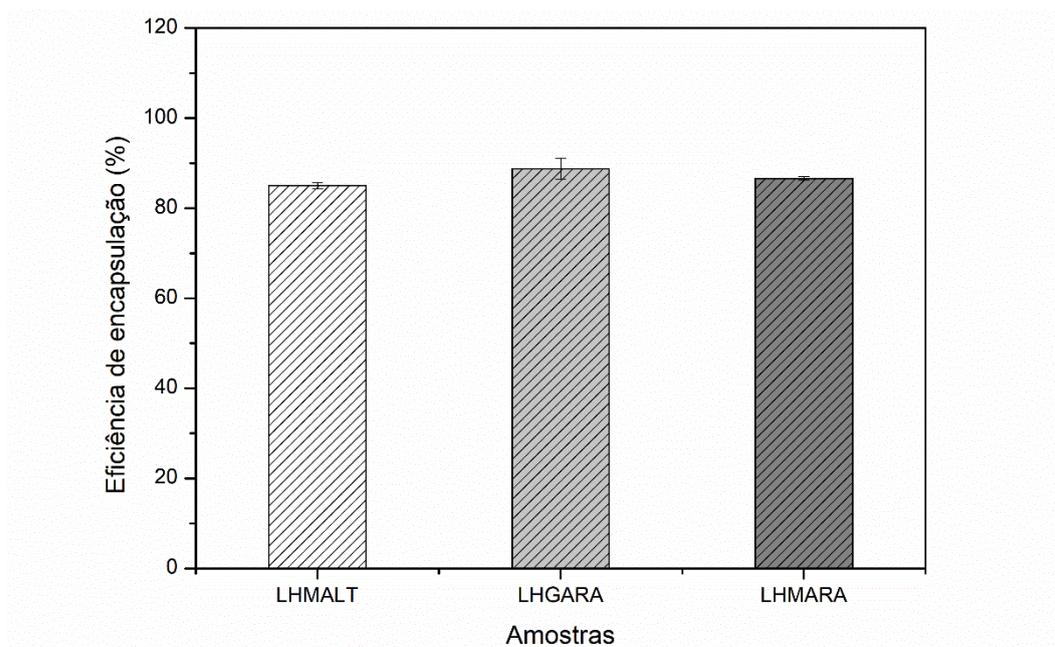
Amostras	Polidispersibilidade (Pdi)
LHLIQ	0,468±0,07 <sup>a</sup>
CONTROLE	0,398±0,01 <sup>ab</sup>
LHMALT	0,377±0,02 <sup>abc</sup>
LHGARA	0,345±0,02 <sup>bc</sup>
LHMARA	0,294±0,03 <sup>c</sup>

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de triplicata. Valores com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Amostras: LHLIQ: Leite humano líquido; CONTROLE: Leite humano liofilizado; LHMALT: Leite humano:Maltodextrina (9:1); LHGARA: Leite humano:Goma arábica (9:1); LHMARA: Leite humano:Maltodextrina:Goma arábica (9:0,5:0,5).

A polidispersibilidade pode ser justificada pela tecnologia de encapsulação utilizada, que se relaciona à organização entre os componentes envolvidos no movimento das partículas [5]. As amostras avaliadas definem diferentes tamanhos dos materiais; quanto mais estreita a distribuição do tamanho das partículas, menor o valor de polidispersibilidade e melhor o sistema de partículas.

### 3.4. Eficiência de encapsulação de microcápsulas de leite humano liofilizadas

Todas as amostras apresentaram boa eficiência de encapsulação (Fig. 4), superior a 85,00 %: sendo  $85,04 \pm 0,71$  % para LHMALT,  $86,64 \pm 0,35$  % para LHMARA e  $88,77 \pm 2,35$  % para LHGARA. Com base nesses resultados, as amostras usando goma arábica como agente encapsulante apresentaram os maiores valores de eficiência de encapsulação, sendo o melhor resultado obtido na forma isolada (LHGARA). Da mesma forma, outros autores relacionam uma maior ação da goma arábica, pois encontraram maiores porcentagens de eficiência de encapsulação do que com a maltodextrina durante a encapsulação de compostos bioativos do bagaço de cana-de-açúcar, conforme considerado por Velasquez-Martinez et al. [36], além do observado por Madene et al. [37], que menciona uma melhor qualidade para encapsulação referindo-se a uma maior proporção de goma arábica. Resultados semelhantes à eficiência de encapsulação foram obtidos por Premi et al. [38], que obtiveram 91,05%, 88,23% e 82,23% nas diferentes proporções de 25:75, 50:50 e 75:25 de maltodextrina: goma arábica usada como combinação de carreadores em óleo de moringa encapsulado em pó.



**Fig. 4.** Eficiência de encapsulação das microcápsulas de leite humano liofilizadas.

A Fig. 4 mostra evidências das possíveis interações intermoleculares entre os agentes encapsulantes utilizados e o leite humano liofilizado, demonstradas pela eficiência de encapsulação, expondo o potencial das características estruturais da goma arábica que lhe permitem atuar como um agente filmogênico adequado, destacado pelo seu caráter anfifílico. No entanto, a maltodextrina apresenta baixa capacidade emulsificante devido à sua estrutura altamente hidrofílica [39].

Diante disso, a porcentagem de encapsulação alcançada na amostra de LHMALT foi a menor; entretanto, todas as amostras apresentaram eficiências de encapsulação superior a 85%, o que pode ser considerado satisfatório para a maioria dos produtos alimentícios. Dessa forma, todas as amostras obtiveram bom potencial para encapsulação de leite humano liofilizado, sendo um processo alternativo. Entretanto, apesar de suas notáveis capacidades, misturas binárias contendo goma arábica podem ser propostas para redução de custos [39].

#### **4. Conclusões**

Os resultados deste estudo mostraram que a aplicação da microencapsulação foi competente, pois foram obtidos valores  $> 85\%$  na determinação da eficiência de encapsulação, além da capacidade de aprisionar componentes do leite humano, e também facilitou a reidratação, principalmente no caso da amostra encapsulada com goma arábica, que foi cinco vezes mais rápida na dissolução e uma vez maior na solubilidade que o CONTROLE. Em geral, as microcápsulas resultaram em cores mais claras que a amostra CONTROLE, sendo a mistura dos dois agentes encapsulantes a amostra com menor variação de cor ( $\Delta E$ ) e menor polidispersibilidade.

Os dados da avaliação tecnológica sugerem que o CONTROLE apresentou maiores teores de umidade e  $A_w$ , e menores níveis de dissolução e solubilidade, confirmando que a

técnica de microencapsulação foi viável. Assim, a goma arábica pode ser utilizada como material de revestimento na matriz leite humano (sozinha ou em combinação com maltodextrina) uma vez que obtenha boas propriedades, provavelmente devido à sua alta capacidade emulsificante, mesmo em baixas concentrações (5 e 10 %).

Por fim, o uso da goma arábica demonstrou competência na obtenção de microcápsulas de leite humano. Para trabalhos futuros, sugere-se que este novo produto seja avaliado quanto às suas características funcionais, como compostos bioativos e estabilidade de armazenamento, para atingir as microcápsulas de leite humano como opção de consumo para bebês.

#### **Declaração de contribuição de autoria do CRediT**

**Eloize Silva Alves:** Conceitualização. Investigação. Visualização. Metodologia. Análise formal. Curadoria de dados. Funções/Escrita – rascunho original; Escrita – revisão e edição.

**Cintia Stefhany Ripke Ferreira:** Conceitualização. Escrita – rascunho original. **Paulo**

**Ricardo Souza:** Análise formal. Investigação. **Andressa Rafaella Silva Bruni:** Escrita – rascunho original. **Matheus Campos Castro:** Curadoria de dados. **Bruno Henrique**

**Figueiredo Saqueti:** Investigação. Visualização. **Oscar Oliveira Santos:** Supervisão.

Curadoria de dados. Recursos. **Grasiele Scaramal Madrona:** Conceitualização.

Supervisão. Escrita – revisão e edição. **Jesui Vergilio Visentainer:** Supervisão. Aquisição de financiamento. Recursos.

#### **Declaração de conflito de interesses**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## **Reconhecimentos**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) #88887.606273/2021-00, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária, Fundação Cargill e Programa Pesquisa para o SUS (PPSUS) pela assistência financeira. Gostariam também de expressar seu agradecimento à Universidade Estadual de Maringá (Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa ou COMCAP) pela disponibilização de equipamentos e parceria na pesquisa, ao Centro de Escrita Acadêmica (CEA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) pelo auxílio na edição do desenvolvimento, e ao Banco de Leite Humano do Hospital Universitário Regional de Maringá pela parceria e disponibilização de amostras de leite humano.

## **Disponibilidade de dados**

Os dados serão disponibilizados mediante solicitação.

## Referências

- [1] E.S. Alves, M.C Castro, B.H. Saqueti, L.P. Manin, R.D. Silveira, P.M. Souza, O.O. Santos, J. V. Visentainer, Whey Isolation from Rejected Human Milk and Its Lipid Content Characterization by GC-FID and ESI-MS, *J. Braz. Chem. Soc.* 32 (2021), 1884-1894, <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210092>.
- [2] A.N. Aryee, T.O. Akanbi, I.D. Nwachukwu, T. Gunathilake, Perspectives on preserving lipid quality and strategies for value enhancement, *Curr. Opin. Food Sci.* 44 (2022) 100802, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.12.011>.
- [3] Q.S. Damaceno, B. Gallotti, I. M. Reis, Y.C. Totte, G.B. Assis, H.C. Figueiredo, T.F. Silva, V. Azevedo, J.R. Nicoli, F.S. Martins, Isolation and Identification of Potential Probiotic Bacteria from Human Milk, *Probiotics Antimicrob. Proteins* (2021) 1-11, <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09866-5>.
- [4] S. Patel, A. Goyal, Applications of natural polymer gum arabic: a review, *Int. J. Food Prop.*, 18 (2015) 986-998, <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.809541>.
- [5] E. A. Cortés-Morales, G. Mendez-Montevalvo, G. Velazquez, Interactions of the molecular assembly of polysaccharide-protein systems as encapsulation materials. A review, *Adv. Colloid Interface Sci.* 295 (2021) 102398, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102398>.
- [6] D. Martysiak-Żurowska, P. Rożek, M. Puta, The effect of freeze-drying and storage on lysozyme activity, lactoferrin content, superoxide dismutase activity, total antioxidant capacity and fatty acid profile of freeze-dried human milk, *Dry. Technol.* 40 (2022) 615-625, <https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1824188>.
- [7] A. Rezvankhah, Z. Emam-Djomeh, G. Askari, Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review, *Dry. Technol.* 38 (2020) 235-258, <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1653906>.

- [8] Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. Resolução da diretoria colegiada-RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2006/res0171\\_04\\_09\\_2006.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2006/res0171_04_09_2006.html), 2006 (acessado 14 Julho 2022).
- [9] M.M. Oliveira, D.C. Aragon, V.S. Bomfim, T.M. Trevilato, L.G. Alves, A.R. Heck, F.E. Martinez, J.S. Camelo Jr, Development of a human milk concentrate with human milk lyophilizate for feeding very low birth weight preterm infants: A preclinical experimental study, PloS one 14 (2019) e0210999, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210999>.
- [10] Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, Codex Alimentarius. Food Additive Details Gum arabic (Acacia gum) (414). Updated up to the 42nd Session of the Codex Alimentarius Commission. International Food Standards programme. <https://www.fao.org/gsfaonline/additives/details.html?id=63&d-3586470-s=5&d-3586470-o=2&lang=>, 2019 (acessado 04 Julho 04 2022).
- [11] European Commission, Regulation No 609/2013 of the European Parliament and the Council as regards the specific compositional and information requirements for infant formula and follow-on formula and as regards requirements on information relating to infant and young child feeding in Official Journal of the European Union. Commission Delegated Regulation 2016/127 of 25 September 2015 supplementing. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32016R0127>. 2015 (acessado 04 Julho 04 2022).

- [12] Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução RDC N.º 44, de 19 de Setembro de 2011, Regulamento Técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância. [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0044\\_19\\_09\\_2011.html](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0044_19_09_2011.html), 2011 (acessado 04 Julho 2022).
- [13] C. Clouard, C. Le Bourgot, F. Respondek, J.E. Bolhuis, W.J. Gerrits, A milk formula containing maltodextrin, vs. lactose, as main carbohydrate source, improves cognitive performance of piglets in a spatial task, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1-12, <https://doi.org/10.3390/nu13051503>.
- [14] Y. Wang, A. Ye, Y. Hou, Y. Jin, X. Xu, J. Han, W. Liu, Microcapsule delivery systems of functional ingredients in infant formulae: Research progress, technology, and feasible application of liposomes, *Trends Food Sci. Technol.* 119 (2022) 36-44, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.016>.
- [15] M.E. Vuillemin, F. Michaux, A.A. Adam, M. Linder, L. Muniglia, J. Jasniewski, Physicochemical characterizations of gum Arabic modified with oxidation products of ferulic acid, *Food Hydrocoll.* 107 (2020) 105919, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105919>.
- [16] E. Karrar, A.A. Mahdi, S. Sheth, I.A.M. Ahmed, M.F. Manzoor, W. Wei, X. Wang, Effect of maltodextrin combination with gum arabic and whey protein isolate on the microencapsulation of gorum seed oil using a spray-drying method, *Int. J. Biol. Macromol.* 171 (2021) 208-216, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.045>.
- [17] C. B. Fritzen-Freire, E.S. Prudêncio, R.D. Amboni, S.S. Pinto, A.N. Negrão-Murakami, F.S. Murakami, Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics, *Int. Food Res. J.* 45, (2012) 306-312, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.020>.

- [18] T.M. Ho, S. Chan, A.J. Yago, R. Shravya, B.R. Bhandari, N. Bansal, Changes in physicochemical properties of spray-dried camel milk powder over accelerated storage, *Food Chem.* 295 (2019) 224-233, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.122>.
- [19] P.B. Pathare, U.L. Opara, F.A. J. Al-Said, Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review, *Food Bioproc. Tech.* 6 (2013) 36-60, <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>.
- [20] L.U.R. Chiavelli, M.B. Galuch, C.E.R. Senes, L.C. Maia, T.A.M. Lopes, K.B. Rufato, O.O. Santos, J.V. Visentainer, Validation of UHPLC-MS/MS Method and Measurement Uncertainty Evaluation for Lactose Quantification in Lactose-Free and Regular UHT Milk, *Food Anal. Methods* 15 (2022) 1418-1431, <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02197-9>.
- [21] M. Thakur, K. Pant, R.R. Naik, V. Nanda, Optimization of spray drying operating conditions for production of functional milk powder encapsulating bee pollen, *Dry. Technol.* 39 (2021) 777-790, <https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1720225>.
- [22] S.S.C. Novaes, F.B.H. Dantas, I.D. Alvim, A.M.R. O. Miguel, S.T. Dantas, R.M.V. Alves, Stability of omega-3 enriched milk powder in different commercial packages stored under accelerated conditions of temperature and relative humidity, *Int. Dairy J.* 88 (2019) 1-9, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.013>.
- [23] F. Weinbreck, I. Bodnár, M.L. Marco, Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products?, *Int. J. Food Microbiol.* 136 (2010) 364-367, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.004>.

- [24] M. Karaaslan, F. Şengün, Ü. Cansu, B. Başıyigit, H. Sağlam, A. Karaaslan, Gum arabic/maltodextrin microencapsulation confers peroxidation stability and antimicrobial ability to pepper seed oil, *Food Chem.* 337 (2021), 127748, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127748>.
- [25] F. Meng, T. Uniacke-Lowe, A.C. Ryan, A.L. Kelly, The composition and physico-chemical properties of human milk: A review, *Trends Food Sci. Technol.* 112 (2021) 608-621, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.040>.
- [26] A.K.M. Masum, J. Chandrapala, T. Huppertz, B. Adhikari, B. Zisu, Influence of drying temperatures and storage parameters on the physicochemical properties of spray-dried infant milk formula powders, *Int. Dairy J.* 105 (2020) 104696. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104696>.
- [27] K. Sarabandi, S.M. Jafari, A.S. Mahoonak, A. Mohammadi, Application of gum Arabic and maltodextrin for encapsulation of eggplant peel extract as a natural antioxidant and color source, *Int. J. Biol. Macromol.* 140 (2019) 59-68, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.133>.
- [28] B. Duan, H.J. So, J.A. Shin, Y. Qin, J. Yang, K.T. Lee, Different content of cholesterol, retinol, and tocopherols in human milk according to its fat content, *Eur. Food Res. Technol.* 247 (2021) 1307-1318, <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03710-4>.
- [29] M. Mansour, M. Salah, X. XU, Effect of microencapsulation using soy protein isolate and gum arabic as wall material on red raspberry anthocyanin stability, characterization, and simulated gastrointestinal conditions, *Ultrason. Sonochem.* 63 (2020) 104927-104936. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104927>.

- [30] Y.R. Kang, Y.K. Lee, Y.J. Kim, Y.H. Chang, Characterization and storage stability of chlorophylls microencapsulated in different combination of gum Arabic and maltodextrin, *Food Chem.* 272 (2019) 337-346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.063>.
- [31] D. Krishnaiah, R. Sarbatly, R. Nithyanandam, Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying, *Chem. Eng. Res. Des.* 90 (2012) 622-632. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2011.09.003>.
- [32] H.H. Mantsch, D. Chapman, *Infrared spectroscopy of biomolecules*, Wiley – Liss, New York, 1996.
- [33] A. Kalušević, S. Lević, B. Čalića, M. Pantić, M. Belović, V. Pavlović, B. Bugarski, J. Milić, Slađana Žilić, V. Nedović, Microencapsulation of anthocyanin-rich black soybean coat extract by spray drying using maltodextrin, gum Arabic and skimmed milk powder, *J. Microencapsul.* 34 (2017) 475-487. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1354939>
- [34] J.K.F. Torres, R. Stephani, G.M. Tavares, A.F. Carvalho, R.G.B. Costa, C.E.R. Almeida, M.R. Almeida, L.F.C. Oliveira, P. Schuck, Í.T. Perrone, Technological aspects of lactose-hydrolyzed milk powder, *Int. Food Res. J.* 101 (2017) 45-53, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.043>.
- [35] Y. Pan, L. Liu, S. Tian, X. Li, M. Hussain, C. Li, L. Zhang, Q. Zhang, Y. Leng, S. Jiang, S. Liang, Comparative analysis of interfacial composition and structure of fat globules in human milk and infant formulas, *Food Hydrocoll.* 124 (2022) 107290, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107290>.

- [36] V. Velazquez-Martinez, D. Valles-Rosales, L. Rodriguez-Uribe, O. Holguin, J. Quintero-Quiroz, D. Reyes-Jaquez, M.I. Rodríguez-Borbon, L.Y. Villagrán-Villegas, E. Delgado, Antimicrobial, shelf-life stability, and effect of maltodextrin and gum arabic on the encapsulation efficiency of sugarcane bagasse bioactive compounds, *Foods* 10 (2021), 116, <https://doi.org/10.3390/foods10010116>.
- [37] A. Madene, M. Jacquot, J. Scher, S. Desobry, Flavour encapsulation and controlled release—a review, *Int. J. Food Sci.* 41 (2006) 1-21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x>.
- [38] M. Premi, H. K. Sharma, Effect of different combinations of maltodextrin, gum arabic and whey protein concentrate on the encapsulation behavior and oxidative stability of spray dried drumstick (*Moringa oleifera*) oil. *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017) 1232-1240, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.160>.
- [39] N. Ozdemir, A. Bayrak, T. Tat, F. Altay, M. Kiralan, A. Kurt, Microencapsulation of basil essential oil: utilization of gum arabic/whey protein isolate/maltodextrin combinations for encapsulation efficiency and in vitro release, *J. Food Meas. Charact.* 15 (2021) 1865-1876, <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00771-z>.

## ARTIGO 2

### **Impacto de Processamentos de Conservação no Perfil Lipídico e nos Fatores Imunológicos IL-10 e TGF- $\beta$ 1 do Soro de Leite Separado do Leite Humano Descartado**

*Eloize Silva Alves,<sup>a</sup> Matheus C. Castro,<sup>a</sup> Bruno H. F. Saqueti,<sup>a</sup> Luciana P. Manin,<sup>a</sup> Josiane B. Alencar,<sup>a</sup> Joana M. V. Zacarias,<sup>a</sup> Andressa R. S. Bruni,<sup>a</sup> Grasielle S. Madrona,<sup>a</sup> Jeane E. L. Visentainer,<sup>a</sup> Marcelo Cristianini,<sup>b</sup> Oscar O. Santos<sup>a</sup> e Jesuí V. Visentainer<sup>a</sup>*

*<sup>a</sup>Laboratório de Química de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá-PR Brasil*

*<sup>b</sup>Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, R. Monteiro Lobato 80, 13083-970 Campinas-SP, Brasil*

**\*Jesuí Vergílio Visentainer, PhD**

E-mail: jesuivv@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3412-897X>

## Resumo

Alternativas de uso de soro podem ser promissoras para destinar o leite humano descarte. Entretanto, os autores desconhecem a literatura sobre tratamentos em soro de leite humano, empregando pasteurização Holder, liofilização, *spray drying* e alta pressão hidrostática. Nesse contexto, o presente estudo objetivou aplicar tratamentos em soro de leite humano e avaliar sua qualidade lipídica e imunológica. Dentre os resultados, evidenciou-se uma diferente formação no perfil de triacilgliceróis após a aplicação de *spray drying* e alta pressão hidrostática, enquanto a pasteurização e a liofilização apresentaram intensidade iônica próxima ao soro de leite humano não tratado (CW). Além disso, a pasteurização mostrou-se adequada para qualidade nutricional lipídica e concentração do fator de transformação do crescimento- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1, do inglês *transforming growth factor*), enquanto foi promovido após liofilização, *spray drying* e alta pressão hidrostática um aumento entre 73 e 80% nos níveis de interleucina-10 (IL-10). Por meio da análise de componentes principais, destacou-se que os processamentos apresentaram divergências quanto aos efeitos causados, com similaridade apenas entre pasteurização e liofilização na composição de ácidos graxos. Entretanto, observou-se que todos os processamentos foram capazes de manter os nutrientes, mesmo com seus efeitos individuais oferecidos. Não obstante, é relevante considerar as características individuais apresentadas e o interesse pela qualidade desejada, o que pode ser promissor como produto complementar à alimentação infantil.

**Palavras-chave:** liofilização; *spray drying*; alta pressão hidrostática; ácido graxo; perfil de triacilglicerol.

## Introdução

O leite humano é essencial para o desenvolvimento do organismo dos recém-nascidos.<sup>1</sup> Recomenda-se que os bebês prematuros sejam alimentados com leite humano proveniente de bancos de leite humano em situações em que a amamentação não esteja disponível,<sup>2</sup> distinguindo que realizam ações como promoção, proteção e suporte ao aleitamento materno, desde a coleta, seleção, classificação, controle de qualidade, processamento, e distribuição do leite humano.<sup>3</sup> Dentre as atividades do banco de leite humano, destaca-se o controle de qualidade, em que cerca de 30% do leite humano recebido é descartado na rede de esgoto devido a irregularidades após sua avaliação.<sup>1</sup>

O reaproveitamento do leite humano descartado devido presença de sujidades envolvendo causas exógenas (por exemplo, cabelos, cílios) é promissor pois pode ser redirecionado como subproduto para o desenvolvimento de novos produtos lácteos, conforme apontam Castro *et al.*<sup>4</sup> Os mesmos autores propõem uma nova finalidade para esse alimento essencial para bebês, reaproveitando o leite humano descartado para compor um sorvete prebiótico, atendendo a alguns parâmetros necessários para sua produção.<sup>4</sup> Além disso, no estudo de Alves *et al.*<sup>5</sup> que utilizaram leite humano descartado de banco de leite humano devido ao atributo sujidade, e isolaram e caracterizaram o teor lipídico do soro de leite humano, obtiveram um produto que conseqüentemente pode ser incluído na introdução alimentar de crianças. Por outro lado, em fórmulas infantis e alimentos funcionais destinados a crianças, foram observados o uso do soro em suas composições, o que garante uma grande variedade de componentes com funções nutricionais e efeitos biológicos importantes.<sup>6-7</sup>

Vale ressaltar que as composições da caseína e das proteínas do soro se diferem entre as espécies de mamíferos, neste sentido, a obtenção do soro de leite humano pode ser derivada pelo emprego da alta força centrífuga, o que conseqüentemente promove a

remoção parcial de gordura, células da glândula mamária, detritos celulares, parte da caseína e ainda das proteínas do soro que repousam no conteúdo sobrenadante.<sup>5,8</sup>

Alguns processamentos podem oferecer maior conservação ao leite humano, identificados pela pasteurização holder e liofilização.<sup>9</sup> A pasteurização holder é considerada um procedimento padrão de bancos de leite humano, realizada por meio da aplicação de temperatura de 62,5 °C por 30 min.<sup>3,10</sup> Por outro lado, a técnica de liofilização favorece a remoção da água da matriz via sublimação, sob condições de pressão de vácuo em baixas temperaturas, seguida de dessorção, gerando benefícios como maior tempo de conservação e menor espaço de armazenamento.<sup>11</sup> No entanto, atualmente, novos métodos estão sendo investigados no leite humano, como a técnica de *spray drying*<sup>12</sup> e o processamento de alta pressão hidrostática (HHP, do inglês *high hydrostatic pressure*).<sup>13</sup> O processamento de *spray drying* pode ser uma alternativa, pois é usado industrialmente para produção de leite bovino em pó.<sup>14</sup> Neste processo, o leite é pulverizado em gotas dentro de uma torre de secagem, onde o produto entra em contato com o ar aquecido.<sup>15-16</sup> Enquanto, a HHP é conhecida por ser um processamento não térmico eficiente na inativação de patógenos em alimentos.<sup>17</sup>

Embora existam estudos sobre o impacto desses processamentos no leite humano, não há relatos deles no soro de leite humano, bem como a avaliação de seus nutrientes. Estudos relatam que os processamentos de secagem (liofilização e *spray drying*) e HHP realizados no leite humano foram capazes de manter a qualidade de uma composição nutricional adequada, perfil lipídico, macronutrientes e componentes imunológicos.<sup>12,17,18</sup> Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade lipídica por meio da determinação do perfil de triacilgliceróis, composição de ácidos graxos, e índices nutricionais, bem como a manutenção de compostos imunológicos pelas concentrações das citocinas interleucina (IL-10) e fator de transformação do crescimento-β1 (TGF-β1, do

inglês *transformation growth factor-β1*) em soro de leite humano submetido a diferentes processamentos (pasteurização Holder, liofilização, *spray drying*, alta pressão hidrostática), comparando-os com soro de leite humano sem tratamento (CW). O melhor tratamento em termos de qualidade nutricional pode ser uma alternativa para uso na alimentação infantil.

## **Materiais e métodos**

### *Reagentes*

Os reagentes utilizados na extração lipídica foram clorofórmio ( $\geq 99,8\%$ ), *n*-heptano ( $\geq 99\%$ ), metanol ( $\geq 99,8\%$ ) e cloreto de sódio ( $\geq 99\%$ ), adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). Para a esterificação, hidróxido de potássio ( $\geq 85\%$ ) adquirido da Dinâmica (São Paulo, Brasil), *n*-heptano ( $\geq 99\%$ ) da Synth (São Paulo, Brasil), padrões de referência de metil tricosanoato (23:0;  $\geq 99\%$ ) e o Mix de éster metílico de ácido graxo C4-C24 insaturado ( $\geq 97\%$ ), ambos adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Para análise do perfil de triacilglicerol, foram utilizados reagentes de grau de cromatografia líquida de alta eficiência, sendo metanol ( $\geq 99,8\%$ ) adquirido da JT Baker® (Philipsburg, EUA) e clorofórmio ( $\geq 99,8\%$ ) da Riedel de Haën (Seelze, Alemanha), respectivamente. Além disso, o uso de formato de amônio ( $\geq 97\%$ ) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha).

### *Amostragem*

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local, número 3.430.478, da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, Paraná, Brasil). Os critérios de exclusão do estudo envolvem as exigências estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).<sup>3</sup> Além disso, a faixa etária para coleta das amostras foi de 18 a 33 anos, sendo não fumantes. Dessa forma, foi coletado leite humano cru maduro no

Hospital Universitário Regional de Maringá, após avaliação da presença de sujidades seguindo protocolo específico para controle de qualidade do leite humano,<sup>3</sup> sob uma temperatura de resfriamento de 4 °C. Posteriormente, aproximadamente 5.000 mL de leite humano maduro adquirido de 10 doadoras diferentes foram misturados e armazenados em um único frasco de vidro com tampa rosqueável, que foi posteriormente armazenado a -18 °C até as etapas seguintes.

#### *Isolamento de proteína de soro de leite humano*

O isolamento do soro de leite humano foi realizado de acordo descrito por Alves *et al.*,<sup>5</sup> onde inicialmente o leite humano foi centrifugado usando uma centrífuga refrigerada modelo Harrier 18/80 (Sanyo MSE, Kent, Reino Unido) a 1500 g por 10 min a 10 °C para separação parcial da camada de gordura manualmente. O leite humano desnatado foi então centrifugado novamente no mesmo equipamento a 6000 g por 30 min a 30 °C para a sedimentação parcial da caseína e separação do soro de leite humano.

O volume obtido do soro de leite humano isolado foi misturado e separado em cinco porções de aproximadamente 800 mL para fins de comparação entre os seguintes tratamentos propostos no presente estudo, denominados como: soro de leite humano não tratado (CW), soro de leite humano pasteurizado (PW, do inglês *pasteurized human whey*), soro de leite humano liofilizado (FDW, do inglês *freeze dried human whey*), soro de leite humano tratado por *spray drying* (SDW, do inglês *spray drying human whey*) e soro de leite humano tratado por alta pressão hidrostática (HHPW, do inglês *high hydrostatic pressure human whey*). Obteve-se assim cinco amostras, nas quais a amostra CW foi armazenada em frasco de vidro com tampa rosqueável, e submetida ao congelamento a -18 °C até o momento das análises. As demais amostras foram consideradas à diferentes processamentos, conforme descrito a seguir.

### *Pasteurização Holder*

A pasteurização foi realizada de acordo a Anvisa;<sup>3</sup> 800 mL de soro de leite humano já armazenado em frasco de vidro foram submetidos a um aquecimento em banho-maria (Solab Científica, modelo SL-152/10L, Piracicaba, Brasil), para isso, o volume foi dividido em quatro frascos contendo 200 mL cada, assim o tratamento foi realizado quatro vezes até atingir o volume total de 800 mL. Para o tratamento, foi aplicado aquecimento até atingir a temperatura de 62,5 °C no centro do frasco, e mantido por 30 min, com agitação manual a cada 5 min durante o processamento. Posteriormente, a amostra intitulada PW foi resfriada por imersão em banho contendo água e gelo até atingir 4 °C. Por fim, a amostra foi armazenada a -18 °C até o momento das análises.

### *Liofilização*

Outra medida de aproximadamente 800 mL de soro de leite humano foi submetida a pasteurização Holder seguindo o protocolo anteriormente citado, visando à garantir a segurança microbiológica frente a microrganismos patogênicos da amostra, uma vez que a liofilização não é capaz de inibi-los, logo após o volume foi armazenado em recipientes apropriados para utilização em liofilizador de bandejas, e congelado de forma preparatória, a -18 °C por 48 h. Após isso, segundo Manin *et al.*,<sup>19</sup> a liofilização foi realizada em liofilizador (Alpha 1 2 LD Plus, modelo 101522, Osterode, Alemanha) a cerca de -54 °C e 0,021 mbar. O processamento de liofilização foi aplicado até a obtenção de peso constante, por aproximadamente 48 h. A amostra seca foi macerada até adquirir um pó fino, denominada de FDW, sendo então transferida para embalagem flexível de polietileno, selada a vácuo e armazenada a -18 °C até a realização das análises. Para a realização das análises a amostra foi reidratada com água destilada na mesma massa de água retirada

durante o processo de secagem, utilizando-se como referência o peso inicial da amostra.

### *Secagem por spray drying*

O processamento por *spray drying* foi realizado de acordo com Castro-Albarrán *et al.*,<sup>20</sup> cerca de 800 mL de soro de leite humano divididos em três alíquotas de mesmo volume, e foram submetidos ao processo de secagem em um mini spray dryer (modelo B-191, Buchi, Suíça), com temperatura de entrada de 175 °C e temperatura de saída de 103 °C, com fluxo de ar pressurizado de 15 mL min<sup>-1</sup> utilizando 100% de ar comprimido. Para realizar o processamento de *spray drying*, foi necessário calcular o rendimento após o término do processamento, para isso, o teor de sólidos solúveis foi medido utilizando um refratômetro digital (Hanna Instruments, modelo HI96801, Brasil). A partir disso, pode-se obter o valor teórico, e após a secagem obteve-se o valor real. Então, o rendimento foi calculado utilizando a equação 1.

$$\text{Rendimento} = \frac{(\text{Valor atual})}{\text{Valor teórico}} \times 100 \quad (1)$$

A amostra SDW seca foi coletada em embalagem flexível de polietileno e mantida a -18 °C até a realização das análises. Para a reidratação do pó obtido foi adicionada água destilada (g) conforme o rendimento do processamento, sendo 1 g de SDW para 11 g de água destilada.

### *Processamento de alta pressão hidrostática (HHP)*

O processamento da amostra HHPW foi realizado de acordo com as especificações de Manin *et al.*,<sup>17</sup> utilizando um equipamento de alta pressão hidrostática (QFP 2L-700 Avure Technologies, Middletown, EUA). Amostras contendo 800 mL foram divididas em

quatro frações, armazenadas em embalagens flexíveis de polietileno, e foram submetidas ao processamento. No reservatório foi utilizada água fria como pressurizador indireto, e a temperatura foi controlada por 5 min quando atingido uma pressão de 600 MPa. A temperatura inicial medida foi de 4 °C e a temperatura final foi de 17,35 °C, respectivamente. A taxa de pressurização foi de 3 °C min<sup>-1</sup> e a descompressão foi praticamente instantânea. As amostras foram misturadas em um único frasco de vidro com tampa rosqueável e mantidas armazenadas a -18 °C até a realização das análises.

#### *Perfil de triacilglicerol (TAG)*

O perfil de triacilglicerol (TAG) foi obtido por infusão direta em um espectrômetro de massas usando uma fonte de ionização por eletrospray (ESI). Os lipídios das amostras foram extraídos de acordo com Folch *et al.*,<sup>21</sup> para isso, os lipídios de 10 mL das amostras foram extraídos com clorofórmio:metanol (2:1, v/v), utilizando agitação magnética (Fisatom, modelo 761-5, São Paulo, Brasil), transformando-o em um sistema bifásico final, que foi decantado e a fase orgânica superior foi descartada. A fase orgânica inferior foi então recuperada, e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo a vácuo e finalmente o lipídio extraído foi devidamente armazenado.

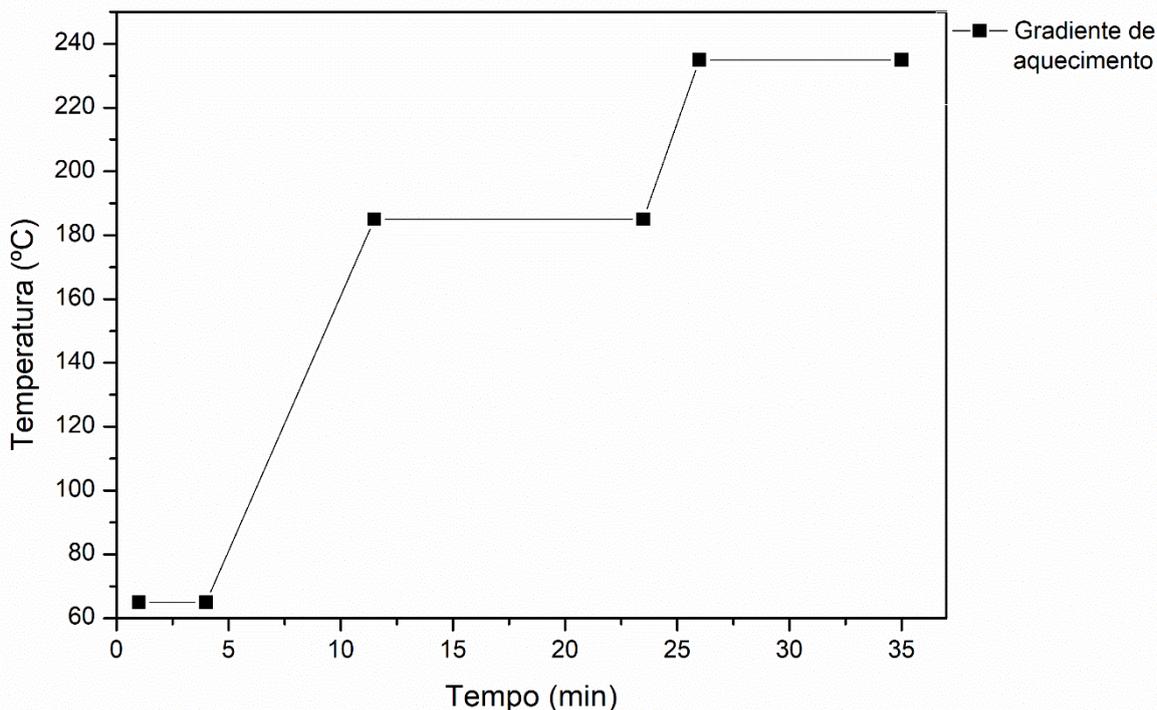
A partir da extração, os lipídios das amostras do soro de leite humano não tratado e dos diferentes processamentos aplicados foram preparados de acordo com Silveira *et al.*,<sup>22</sup> onde aproximadamente 50,0 µL do lipídio foram adicionados a 950,0 µL de clorofórmio. Em seguida, 5,0 µL desta solução foram transferidos para um frasco e 1,0 mL de solução de metanol:clorofórmio 9:1 (v v<sup>-1</sup>) foi adicionado. Para obter os íons de amônio [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 20,0 µL de formiato de amônio 0,1 mol L<sup>-1</sup> preparado em metanol foi adicionado à solução final. As soluções preparadas foram infundidas a um fluxo de vazão de 10,0 µL min<sup>-1</sup> diretamente em um MS triplo quadrupolo Xevo TQ D<sup>TM</sup> (Waters, Massachusetts,

EUA) equipado com um spray ESI Z™, operando em modo íon positivo (ESI(+)) de acordo com as seguintes condições: vazão de gás de dessolvatação (500 L h<sup>-1</sup>), temperatura da fonte (150 °C), temperatura de dessolvatação (200 °C), tensão capilar e do cone (3,00 kV e 20,00 V, respectivamente), avaliadas na razão massa-carga ( $m/z$ ) realizando uma varredura na faixa de  $m/z$  500-1100. Os resultados obtidos foram determinados usando o software MassLynx™.

#### *Composição de ácidos graxos*

Os lipídios das amostras foram extraídos de acordo com Folch *et al.*<sup>21</sup> Posteriormente, os ésteres metílicos de ácidos graxos foram preparados por metilação de lipídios totais de acordo com a Organização Internacional para Padronização nº 12966:2017.<sup>23</sup>

Posteriormente, todas as amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso (Thermo Scientific, Trace GC Ultra, Waltham, EUA) com um detector de ionização de chama, coluna capilar CP-7420 (tamanho de 100,0 m, diâmetro interno de 0,25 mm e filme fino de cianopropil de 0,25 µm como fase estacionária) (Agilent, Saint Clara, EUA) e injetor split/splitless. As temperaturas do detector e do injetor estavam em 250 e 230 °C, respectivamente. O aquecimento do forno foi programado em gradiente de aquecimento, iniciando em 65 °C e mantido por 4 min, então aquecido a 185 °C a 16 °C min<sup>-1</sup> e mantido por 12 min, então aquecido a 235 °C a 20 °C min<sup>-1</sup> e mantido por 9 min, conforme mostrado na Figura 1.



**Figura 1.** Gradiente de aquecimento da corrida cromatográfica da composição de ácidos graxos.

As vazões de gás utilizadas foram de  $1,4 \text{ mL min}^{-1}$  para o gás de arraste hidrogênio ( $\text{H}_2$ ),  $30 \text{ mL min}^{-1}$  para o gás de reposição nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) e 30 e  $300 \text{ mL min}^{-1}$  para os gases de chama ( $\text{H}_2$  e ar sintético, respectivamente). O modo de injeção dividida foi utilizado com uma proporção de 1:100 e o volume de injeções de amostra foi de  $2,0 \mu\text{L}$ . Conseqüentemente, neste estudo, os padrões internos metil tricosanoato (23:0;  $\geq 99\%$ ) e Mix de éster metílico de ácido graxo C4-C24 insaturado ( $\geq 97\%$ ) foram injetados junto com as amostras. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos constituintes da amostra com o padrão analítico Mix de éster metílico de ácido graxo C4-C24, e a massa lipídica foi calculada em relação ao 23:0. As áreas dos picos foram determinadas usando o software ChromQuest 5.0 e a composição de ácidos graxos foi expressa em massa ( $\text{mg g}^{-1}$  de lipídio). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

### Qualidade nutricional lipídica de soro de leite humano

Considerando a composição de ácidos graxos, a qualidade nutricional lipídica foi avaliada por meio de 8 índices: razão entre a soma de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e soma de ácidos saturados (AGS) (equação 2), além da razão entre a soma do grupo de ácidos graxos ômega-6 e a soma do grupo de ácidos graxos ômega-3 (equação 3),<sup>24</sup> a razão entre o conteúdo de ácido graxo linoleico (LA, do inglês *linoleic acid*) e ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA, do inglês  *$\alpha$ -linolenic acid*) (equação 4),<sup>25</sup> a soma dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA, do inglês, *eicosapentaenoic acid*) e docosahexaenóico (DHA, do inglês *docosahexaenoic acid*) (equação 5), também a proporção de ácidos graxos hipocolesterolêmicos/hipercolesterolêmicos (H/H) (equação 6),<sup>26</sup> bem como os índices de aterogenicidade (IA) (equação 7) e índice de trombogenicidade (IT) (equação 8),<sup>27</sup> e, finalmente, o índice de promoção da saúde (HPI, do inglês *health promotion index*) (equação 9).<sup>28</sup> Os valores foram submetidos às seguintes equações:

$$\text{Proporção de ácidos graxos poliinsaturados e saturados} = \frac{\Sigma[\text{AGPI}]}{\Sigma[\text{AGS}]} \quad (2)$$

$$\text{Proporção omega 6 e omega 3} = \frac{\Sigma[n - 6]}{\Sigma[n - 3]} \quad (3)$$

$$\text{LA/ALA} = \frac{18:2n - 6}{18:3n - 3} \quad (4)$$

$$\text{Soma dos ácidos graxos essenciais} = \text{EPA} + \text{DHA} \quad (5)$$

H/H

$$= \frac{[(18:1n - 9 + 18:2n - 6 + 18:3n - 3 + 20:3n - 6 + 20:4n - 6 + 20:5n - 3 + 22:6n - 3)]}{(12:0 + 14:0 + 16:0)}$$

$$IA = \frac{[12:0 + (4 \times 14:0) + 16:0]}{AGMI + n - 6 + n - 3} \quad (7)$$

$$IT = \frac{(14:0 + 16:0 + 18:0)}{[(0.5 \times AGMI) + (0.5 \times n - 6) + (3 \times n - 3) + (\frac{n-3}{n-6})]} \quad (8)$$

$$HPI = \frac{AGMI + n - 6 + n - 3}{[12:0 + (4 \times 14:0) + 16:0]} \quad (9)$$

Onde AGMI: ácido graxo monoinsaturado.

#### *Avaliação da concentração de IL-10 e TGF-β1*

As amostras de cada processamento foram separadas em alíquotas de 10 mL e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até a realização das análises imunológicas. IL-10 e TGF-β1 foram dosados em todas as amostras, soro de leite humano não tratado (CW) e nos diferentes processamentos aplicados. Os níveis de IL-10 foram avaliados usando o kit de ensaio imunoenzimático humano (ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) de IL-10 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Burlington, Canadá). A dosagem de TGF-β1 foi realizada por ensaio imunoenzimático humano de TGF-β1 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Inc., Burlington, Canadá). Ambos seguem as recomendações do fabricante. A absorbância dos testes foi interpretada em um leitor de microplacas ASYS™, modelo EXPERT PLUS (ASYS Expert Plus, Cambridge, Reino Unido). Todas as amostras foram analisadas em triplicata e suas concentrações foram expressas em pg mL<sup>-1</sup>.

### *Análise estatística*

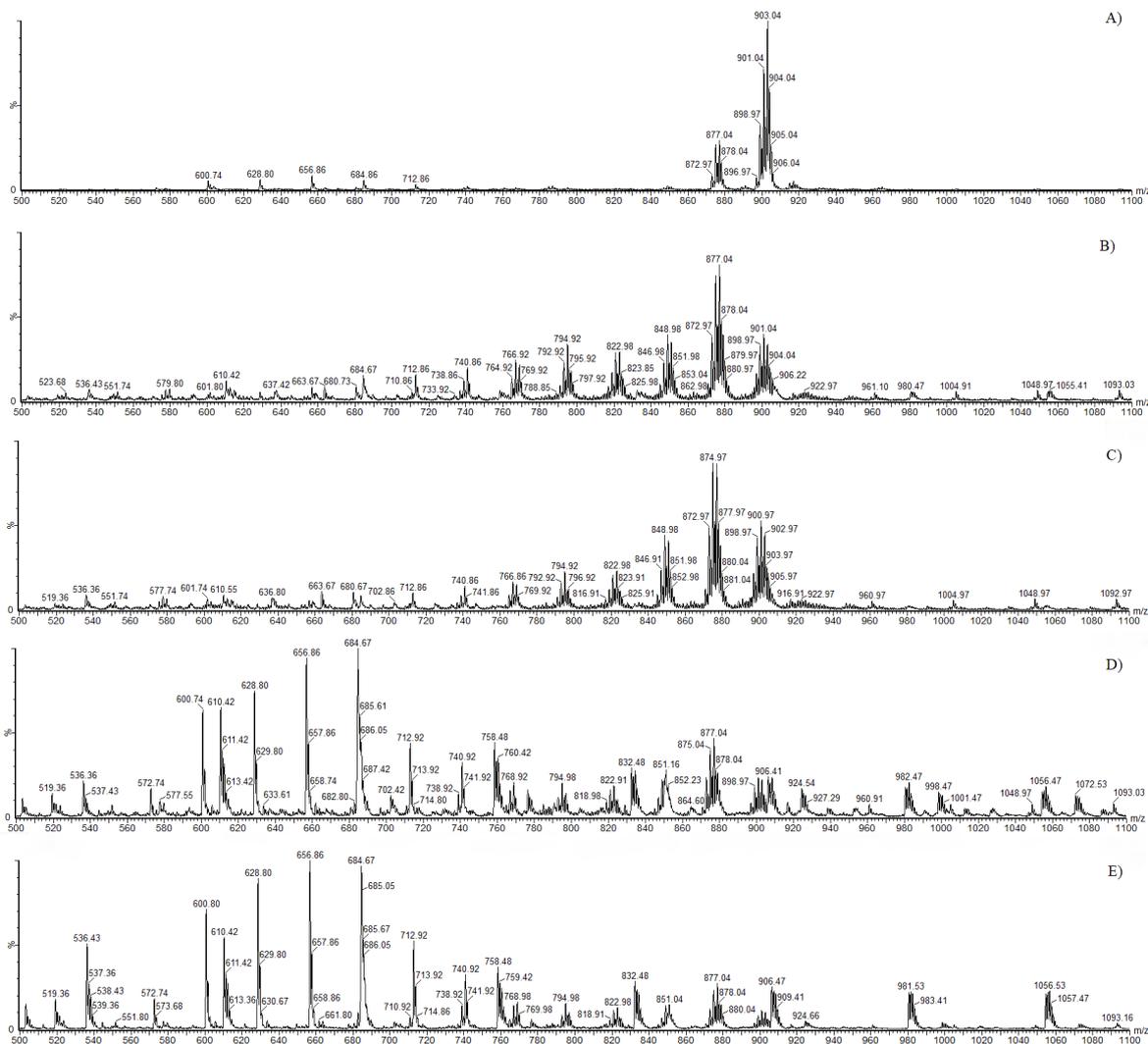
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Rstudio.<sup>29</sup> Os dados da composição de ácidos graxos, índices de qualidade nutricional lipídica e análises imunológicas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparação de médias. Adicionalmente, a técnica de exploração multivariada da análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) foi aplicada a esses dados, realizada por meio dos comandos *Factorextra* e *FactoMineR*.

## **Resultados e Discussão**

### *Perfil de triacilglicerol*

As informações sobre o perfil lipídico de TAGs permitem uma orientação sobre as propriedades funcionais dos lipídios e do conteúdo de ácidos graxos presentes na dieta,<sup>18</sup> além do comportamento após o processamento, caracterizando assim sua abrangência de classe lipídica. Portanto, no presente estudo, os TAGs foram identificados por seus espectros de massas considerando os valores de  $m/z$   $[M + H]^+$ , o que permite embasar-se nas metodologias já consolidadas na literatura.<sup>5,17,19,22,30-37</sup> Pelas condições espectrométricas de massa não foi possível identificar TAGs isoméricos, ou seja, aqueles que diferem nas posições dos radicais acila. Dessa forma, as abreviações dos radicais acila dos TAGs avaliados neste estudo não necessariamente informam as posições das moléculas de cada TAG.

O perfil lipídico TAG das amostras é mostrado na Figura 2 e na Tabela 1. Na Figura 2, as intensidades determinadas por infusão direta em ESI-MS  $[M + NH_4]^+$  são mostradas em regiões específicas de  $m/z$  nas quais os íons TAGs estão presentes em cada amostra.



**Figura 2.** Espectros de massa TAG ESI (+) variando de  $m/z$  500-1100 avaliados em soro de leite humano não tratado (CW) e outro soro de leite humano aplicado em diferentes processamentos. (A) CW; (B) PW; (C) FDW; (D) SDW; (E) HHPW.

A amostra intitulada CW (Figura 2a) apresentou o íon mais intenso (100%) na região  $m/z$  903,04, enquanto na PW (Figura 2b) foi exibido no  $m/z$  877,84, em FDW (Figura 2c) na região  $m/z$  874,97, para SDW (Figura 2d) na região  $m/z$  684,67, e HHPW (Figura 2e) na região  $m/z$  656,86. No entanto, o glóbulo de gordura do leite humano tem cerca de 98% de lipídios neutros (triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis), que são apresentados como as moléculas lipídicas predominantes. No entanto, também está envolvido em sua membrana estrutural com pequenas quantidades de fosfolipídios e colesterol, e outros componentes.<sup>38</sup>

Portanto, como demonstrado por Silveira *et al.*<sup>22</sup> a técnica por infusão direta em ESI-MS mostra-se eficaz para caracterizar a composição de TAG, pois possui a capacidade de separação por massa e carga ( $m/z$ ), o que possibilita analisar misturas químicas complexas, caracterizando uma composição molecular. No presente estudo, investigamos o perfil de TAG das amostras entre a região  $m/z$  530-1110, seguindo o estudo de Tu *et al.*<sup>39</sup> que caracterizaram a identificação de TAGs no leite humano maduro entre  $m/z$  572-984. Outro perfil de identificação de TAGs foi avaliado entre o intervalo  $m/z$  500-1000.<sup>36</sup>

A amostra FDW foi semelhante ao estudo de Manin *et al.*,<sup>19</sup> apresentando 98,63% de intensidade na região  $m/z$  874, durante sua avaliação da estabilidade lipídica de leite humano liofilizado, exibindo esse perfil de TAG no dia 0 após a liofilização. Quanto à amostra SDW, este é o primeiro estudo que avalia o perfil lipídico do TAG por infusão direta em ESI-MS de derivado do leite humano após a aplicação do processamento de *spray drying*. É perceptível que o perfil lipídico do TAG nos espectros das amostras SDW e HHPW assumiu outro formato, apresentando o pico espectral mais intenso entre a região  $m/z$  684-656, respectivamente, isso porque apresentaram um perfil de ácidos graxos diferente quando comparados às outras amostras de soro de leite humano avaliadas neste estudo

A Tabela 1 expressa os resultados em intensidade relativa, na qual foi possível observar 41 intensidades iônicas dos TAGs de perfil do soro de leite humano sem tratamento (CW) e após o processamento, sendo encontradas na região entre  $m/z$  536 e 906.

**Tabela 1.** Intensidade relativa dos íons do perfil de triacilglicerol determinado por ESI(+)-MS de soro de leite humano não tratado (CW) e soros aplicados diferentes processamentos.

<i>m/z</i>	<b>Amostras</b>				
	<b>CW</b>	<b>PW</b>	<b>FDW</b>	<b>SDW</b>	<b>HHPW</b>
536	0,22	8,76	10,47	21,47	50,70
600	5,31	5,01	3,52	63,43	71,14
601	3,30	6,59	7,49	31,14	37,41
610	0,54	15,21	10,09	64,94	54,32
611	0,36	9,18	5,86	39,34	33,00
628	5,95	6,45	4,00	74,71	89,56
629	3,12	3,80	2,40	45,89	56,21
656	8,35	10,54	6,42	94,31	100,00
657	5,32	6,55	3,94	68,35	74,58
658	2,54	6,27	6,06	31,44	33,76
684	5,72	19,04	9,79	100,00	96,95
685	4,15	13,90	6,94	76,46	81,84
686	2,02	8,13	4,05	45,23	43,34
712	3,23	19,51	11,71	43,72	52,61
713	2,63	16,29	9,71	38,04	45,09
740	2,19	24,59	16,25	32,67	32,52
758	0,61	8,27	3,31	44,40	37,19
794	1,17	41,62	26,15	20,42	15,41
848	2,60	48,57	51,06	22,14	13,63
849	2,48	46,75	47,38	22,24	14,12
850	1,76	43,28	47,18	24,64	14,44
851	1,74	42,97	45,39	28,16	14,79

872	8,67	47,37	56,13	23,19	12,13
873	8,26	44,14	51,92	23,73	11,85
874	26,91	91,79	100,00	38,86	22,19
875	26,27	90,86	96,56	40,04	23,13
876	28,30	98,56	99,82	44,40	26,47
877	29,13	100,00	99,23	46,74	27,14
878	16,33	58,93	56,84	27,47	15,60
879	6,14	48,49	43,99	26,36	14,71
896	7,25	20,16	24,95	8,49	3,82
897	6,65	19,12	23,19	8,45	3,49
898	38,40	40,50	49,18	18,09	7,90
899	37,86	37,39	46,58	17,98	8,24
900	70,89	48,24	60,68	22,96	10,77
901	71,74	49,27	59,85	23,51	11,19
902	96,78	41,02	51,41	22,19	10,32
903	100,00	41,60	50,49	22,54	10,34
904	59,68	25,86	29,76	13,73	6,15
905	25,87	20,99	25,27	10,83	5,41
906	9,44	15,05	15,01	23,90	25,03

---

Os resultados foram expressos como a média de três réplicas espectrais. CW: soro de leite humano não tratado; PW: soro de leite humano pasteurizado; FDW: soro de leite humano liofilizado; SDW: soro de leite humano aplicado por *spray drying*; HHPW: soro de leite humano aplicado por alta pressão hidrostática.

Na Tabela 1, a amostra CW apresenta seus maiores íons espectrais entre a região  $m/z$  900-904, enquanto a amostra PW na região  $m/z$  874-878, além da amostra FDW apresentar na região  $m/z$  874-877, e 60,68% na região  $m/z$  900. Já as amostras SDW e HHPW, ambas apresentaram perfil lipídico alterado quando comparadas às demais amostras, onde SDW apresentou maior intensidade na região  $m/z$  684, e HHPW na região  $m/z$  656.

De acordo com Mitsutake *et al.*,<sup>40</sup> o íon precursor  $m/z$  903 visualiza o TAG OOO, caracterizando assim o íon presente na amostra CW. Além disso, acompanhou a teoria de Manin *et al.*,<sup>19</sup> que verificaram o íon  $m/z$  874 com características das moléculas de TAG compostas por ácido oleico (O, 18:1n-9), ácido palmitoleico (Po, 16:1n-9), ácido palmítico (P, 16:0), e ácido linoleico (L, 18:2n-6), definindo as moléculas OPoO e LPO, que foram identificadas principalmente na amostra FDW. É importante definir o perfil de TAG do soro de leite humano, pois se conhece a constituição da molécula de TAG do leite humano, sendo cerca de 65% do 16:0 se localizando na posição central (Sn-2), enquanto as posições Sn-1 e Sn-3 são geralmente ocupadas pelo ácido oleico (O, 18:1n-9) e ácido linoleico (L, 18:2n-6), que assim favorecem a hidrólise dos ácidos graxos 18:1n-9 e 18:2n-6 pela lipase pancreática, quando posicionados nas extremidades da molécula de TAG, enquanto o 16:0 pode ser absorvido juntamente com os sais biliares.<sup>41</sup>

Além disso, a rápida hidrólise pode ser proporcionada pela presença de ácidos graxos saturados e ácidos graxos monoinsaturados no perfil de TAG, assim a particularidade presente no soro de leite humano torna-se importante para um produto que é facilmente absorvido e auxilia no processo de digestão do bebê, fato que foi comprovado estar presente em todas as amostras avaliadas.<sup>6</sup> Portanto, o estudo do perfil lipídico do TAG torna-se relevante, pois a numeração estereoespecífica (Sn) define a posição em que os ácidos graxos na molécula do TAG, o que conseqüentemente determina sua qualidade

nutricional lipídica e influência no metabolismo humano, como digestão, absorção e distribuição no organismo.<sup>18</sup>

### *Composição de ácidos graxos*

A definição da composição dos ácidos graxos permite detalhar do valor nutricional e físico-químico dos alimentos. De acordo com a Tabela 2, foram identificados e quantificados 29 ácidos graxos (mg g<sup>-1</sup> de lipídio) em amostras de soro de leite humano aplicadas em diferentes processamentos.

**Tabela 2.** Composição de ácidos graxos do soro de leite humano não tratado (CW) e outros soros de leite humano aplicados diferentes processamentos

Composição de ácidos graxos	Amostras				
	CW	PW	FDW	SDW	HHPW
8:0	0,68 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>b</sup>
10:0	14,35 ± 1,30 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,05 <sup>c</sup>	3,82 ± 0,46 <sup>c</sup>	6,37 ± 0,76 <sup>b</sup>	2,11 ± 0,26 <sup>c</sup>
12:0	174,87 ± 6,07 <sup>a</sup>	34,48 ± 1,68 <sup>c</sup>	55,08 ± 10,78 <sup>b</sup>	68,30 ± 7,97 <sup>b</sup>	22,71 ± 0,18 <sup>c</sup>
14:0	87,58 ± 2,19 <sup>a</sup>	29,28 ± 1,43 <sup>cd</sup>	37,55 ± 4,83 <sup>bc</sup>	43,50 ± 4,63 <sup>b</sup>	22,01 ± 0,03 <sup>d</sup>
14:1n-9	0,09 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>b</sup>
15:0	0,43 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,79 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,93 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>e</sup>
16:0	90,54 ± 1,33 <sup>a</sup>	78,51 ± 2,52 <sup>bc</sup>	86,51 ± 6,85 <sup>ab</sup>	71,24 ± 3,14 <sup>cd</sup>	65,38 ± 2,49 <sup>d</sup>
16:1n-7	0,33 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,03 <sup>b</sup>
16:1n-9	1,77 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,31 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,18 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,88 ± 0,09 <sup>c</sup>	2,30 ± 0,09 <sup>b</sup>
17:0	0,61 ± 0,06 <sup>c</sup>	1,12 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,91 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,05 <sup>b</sup>
17:1n-9	0,21 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,44 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,07 <sup>ab</sup>
18:0	32,43 ± 0,41 <sup>a</sup>	26,80 ± 0,57 <sup>b</sup>	27,60 ± 0,79 <sup>b</sup>	24,91 ± 0,69 <sup>c</sup>	24,55 ± 0,73 <sup>c</sup>
18:1n-9	99,48 ± 1,34 <sup>b</sup>	112,83 ± 1,74 <sup>a</sup>	94,59 ± 3,78 <sup>b</sup>	64,95 ± 2,91 <sup>c</sup>	63,99 ± 2,02 <sup>c</sup>

18:2n-6	53,28 ± 0,74 <sup>b</sup>	79,42 ± 0,10 <sup>a</sup>	72,00 ± 5,95 <sup>a</sup>	36,49 ± 2,72 <sup>c</sup>	37,03 ± 1,44 <sup>c</sup>
18:2n-6 (Cis9,trans11)	0,10 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>b</sup>
18:2n-6 trans10,Cis12	0,20 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>ab</sup>
18:3n-3	1,25 ± 0,05 <sup>c</sup>	2,34 ± 0,15 <sup>b</sup>	3,67 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,20 <sup>c</sup>	1,65 ± 0,12 <sup>c</sup>
18:3n-6	0,08 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,25 ± 0,00 <sup>b</sup>
20:0	0,85 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,56 ± 0,11 <sup>b</sup>	0,50 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,49 ± 0,06 <sup>b</sup>
20:1n-9	0,67 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,69 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,72 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>c</sup>
21:0	0,49 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,67 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,62 ± 0,05 <sup>a</sup>
20:3n-6	0,38 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,85 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,94 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,02 <sup>b</sup>
20:3n-3	0,40 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,01 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,74 ± 0,05 <sup>c</sup>
20:4n- 6	0,06 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,02 <sup>b</sup>
22:0	0,54 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,50 ± 0,04 <sup>a</sup>
20:5n-3	0,10 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,21 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>a</sup>
24:0	0,36 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,43 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,05 <sup>bc</sup>	0,27 ± 0,04 <sup>c</sup>
24:1n-9	0,09 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,17 ± 0,00 <sup>b</sup>
22:6n-3	0,16 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,34 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>b</sup>
Σ(n-3)	1,91 ± 0,01 <sup>d</sup>	3,90 ± 0,08 <sup>b</sup>	5,07 ± 0,40 <sup>a</sup>	2,45 ± 0,22 <sup>cd</sup>	2,90 ± 0,11 <sup>c</sup>
Σ(n-6)	54,09 ± 0,72 <sup>b</sup>	81,08 ± 0,06 <sup>a</sup>	73,72 ± 6,09 <sup>a</sup>	37,79 ± 2,68 <sup>c</sup>	38,48 ± 1,43 <sup>c</sup>
ΣAGS	403,72 ± 11,45 <sup>a</sup>	175,28 ± 6,15 <sup>cd</sup>	214,58 ± 23,46 <sup>bc</sup>	217,60 ± 17,17 <sup>b</sup>	139,66 ± 3,04 <sup>d</sup>
ΣAGMI	102,64 ± 1,28 <sup>b</sup>	118,37 ± 1,76 <sup>a</sup>	99,98 ± 3,76 <sup>b</sup>	68,14 ± 2,96 <sup>c</sup>	67,95 ± 2,14 <sup>c</sup>
ΣAGPI	56,00 ± 0,70 <sup>b</sup>	84,98 ± 0,02 <sup>a</sup>	78,79 ± 6,49 <sup>a</sup>	40,24 ± 2,90 <sup>c</sup>	41,38 ± 1,32 <sup>c</sup>
ΣTOTAL	562,37 ± 13,44 <sup>a</sup>	378,62 ± 7,93 <sup>bc</sup>	393,36 ± 33,70 <sup>b</sup>	325,98 ± 23,03 <sup>c</sup>	248,99 ± 6,50 <sup>d</sup>

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de triplicata. Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey; CW: soro de leite humano não tratado; PW: soro de leite humano pasteurizado; FDW: soro de leite humano liofilizado; SDW: soro de leite humano aplicado por *spray drying*; HHPW: soro de leite humano aplicado por alta pressão hidrostática; AGS: ácido graxo saturado; AGMI: ácido graxo monoinsaturado; AGPI: ácido graxo poliinsaturado.

O ácido oleico (O, 18:1n-9) foi o que apresentou maior concentração nas amostras PW e FDW, já nas amostras SDW e HHPW o ácido graxo com maior concentração foi o ácido palmítico (P, 16:0), enquanto para CW foi o ácido láurico (La, 12:0). Assim, a maior concentração de ácido graxo saturado (AGS) presente nas amostras foi o ácido palmítico (P, 16:0), exceto na amostra CW que apresentou ácido láurico (La, 12:0) como majoritário ( $p < 0,05$ ). O ácido graxo 12:0 está relacionado à atividade antimicrobiana, este é incorporado à camada lipídica, onde causam instabilidade da membrana lipídica, o que resulta na ruptura do revestimento lipídico e morte do microrganismo.<sup>42</sup> Ainda, de modo geral no leite humano, o ácido graxo 16:0 se encontra na posição central (ou seja, Sn-2) da molécula TAG, dessa forma, é facilmente absorvido, resultando em diversos benefícios para o recém-nascido, como a melhora do desconforto intestinal e redução de cólicas, e além disso, também influencia nos níveis do neurotransmissor anandamida que é responsável por efeitos analgésicos.<sup>43</sup>

Na literatura, verifica-se que os ácidos graxos 15:0, 17:0 e 21:0 podem estar relacionados à ingestão alimentar materna, o que geralmente permite que esses ácidos graxos sejam marcadores de gordura de ruminantes, azeite de oliva extravirgem ou ovos.<sup>44</sup> <sup>46</sup> Outros estudos também encontraram ácidos graxos com carbono ímpar no leite humano.<sup>5,18,47,48</sup> Além disso, vale ressaltar que nos estudos atuais o processo demonstrou potencial para a manutenção desses ácidos graxos.

O ácido graxo monoinsaturado (AGMI) encontrado em maior quantidade em todas as amostras foi o ácido oleico (O, 18:1n-9), concordando com os estudos de Manin *et al.*<sup>19</sup> que avaliaram a qualidade lipídica do leite humano liofilizado por seis meses. Também corrobora os resultados de Rydlewski *et al.*,<sup>49</sup> que avaliaram o perfil lipídico e a composição de ácidos graxos no leite humano, sendo em ambos os estudos foram determinados o ácido oleico como o ácido graxo monoinsaturado de maior concentração. Manin *et al.*<sup>17</sup>

mencionaram a importância do ácido graxo 18:1n-9 na dieta de lactentes como fonte influente de energia e componente estrutural do cérebro, além de auxiliar na absorção de gordura pelo intestino.

O ácido graxo poliinsaturado (AGPI) encontrado em maior quantidade foi o ácido linoleico (L, 18:2n-6), este é considerado um ácido graxo estritamente essencial e um precursor do ácido araquidônico (AA, 20:4n-6), e além disso, ambos estavam presentes nas amostras. Entretanto, outros ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa também foram encontrados, como o ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA, 18:3n-3), um precursor do ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e do ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), considerados fontes importantes no desenvolvimento visual e cerebral durante o progresso perinatal. Portanto, pode-se afirmar que todas as amostras de soro de leite humano apresentam tanto ácidos graxos estritamente essenciais quanto seus precursores, os ácidos graxos essenciais.

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, considerados essenciais, possuem diversas funções importantes para o bebê, pois são responsáveis pelo desenvolvimento cognitivo, visual e imunológico, além de proteger contra alergias, asma e obesidade infantil. Para os bebês, é necessário consumir esses ácidos graxos diretamente da amamentação, pois, apesar desses ácidos graxos serem metabolizados pelo corpo humano, o recém-nascido não tem capacidade total de convertê-los, devido à imaturidade fisiológica.<sup>43</sup>

Ao avaliar o ácido linoleico conjugado cis9,trans11, os resultados das amostras de soro de leite humano quando submetidas a diferentes processamentos não apresentaram diferença estatística entre as amostras PW e FDW, representando assim as maiores concentrações, enquanto as demais amostras CW, SDW e HHPW também não apresentaram diferenças entre si, porém com resultados menores. Para o ácido linoleico conjugado trans10,cis12, as amostras CW e HHPW apresentaram valores maiores, enquanto

as demais foram semelhantes entre si, resistindo ao processamento aplicado.

Ainda, na Tabela 2, na soma de ácidos graxos totais ( $\Sigma_{total}$ ), a amostra que apresentou maior valor foi CW ( $562,37 \pm 13,44$ ), e a menor foi HHPW ( $248,99 \pm 6,50$ ). As amostras avaliadas apresentam sua maior quantificação na soma de ácidos graxos saturados ( $\Sigma_{AGS}$ ), seguida pela soma de ácidos graxos monoinsaturados ( $\Sigma_{AGMI}$ ) e pela soma de ácidos graxos poliinsaturados ( $\Sigma_{AGPI}$ ) quando comparadas entre si, respectivamente. Em relação aos  $\Sigma_{Total}$ , os  $\Sigma_{AGS}$  das amostras representam cerca de 72% (CW) a 46% (PW), enquanto os  $\Sigma_{AGMI}$  variaram de 31% (PW) a 18% (CW), e os  $\Sigma_{AGPI}$  de 22% (PW) e próximo a 10% para CW. Representando de forma geral, que houve uma alteração na composição dos ácidos graxos ao aplicar os processamentos.

Portanto, esta composição de ácidos graxos indica que o processamento menos favorável foi o HHPW, pois apresentou menores valores para os  $\Sigma_{AGS}$ ,  $\Sigma_{AGMI}$ ,  $\Sigma_{AGPI}$  e conseqüentemente  $\Sigma_{Total}$ , seguido pelo SDW que também teve baixo teor quando verificado entre os processamentos. Em comparação, PW e FDW foram semelhantes em termos de composição de  $\Sigma_{Total}$ , portanto esses resultados corroboram com os de Manin *et al.*,<sup>19</sup> que mostraram que a composição de ácidos graxos do leite humano não apresenta diferenças significativas entre o leite humano pasteurizado e o liofilizado.

### *Qualidade nutricional lipídica*

A composição dos ácidos graxos possui características individuais, influenciadas por fatores como condições de armazenamento, incluindo a temperatura do processamento, portanto, para determinar o valor nutricional lipídico, são indicadas as relações entre os ácidos graxos individuais ou seus grupos. A Tabela 3 mostra os resultados dos índices de qualidade nutricional lipídica do soro de leite humano CW (não tratado) e nos diferentes processamentos.

**Tabela 3.** Índices de qualidade nutricional lipídica do soro de leite humano não tratado (CW) e de outros soros humanos aplicando diferentes processamentos

Índices	Amostras				
	CW	PW	FDW	SDW	HHPW
<b>ΣAGPI/ AGS</b>	0,14 ± 0,00 <sup>e</sup>	0,47 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>c</sup>
<b>Σn-6/n-3</b>	28,29 ± 0,59 <sup>a</sup>	20,78 ± 0,46 <sup>b</sup>	14,54 ± 0,06 <sup>cd</sup>	15,46 ± 0,32 <sup>c</sup>	13,29 ± 1,00 <sup>d</sup>
<b>LA/ALA</b>	42,55 ± 2,36 <sup>a</sup>	34,01 ± 2,26 <sup>b</sup>	19,63 ± 0,36 <sup>d</sup>	25,14 ± 1,59 <sup>c</sup>	22,59 ± 2,54 <sup>cd</sup>
<b>EPA + DHA</b>	0,26 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,55 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,51 ± 0,03 <sup>ab</sup>
<b>H/H</b>	0,44 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,37 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,56 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,93 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>IA</b>	3,88 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,04 <sup>d</sup>	1,63 ± 0,11 <sup>c</sup>	2,89 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,61 ± 0,03 <sup>c</sup>
<b>IT</b>	2,50 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,03 <sup>e</sup>	1,48 ± 0,03 <sup>d</sup>	2,31 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,81 ± 0,01 <sup>c</sup>
<b>HPI</b>	0,26 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,88 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,62 ± 0,01 <sup>b</sup>

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) de triplicata. Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. CW: soro de leite humano de CW; PW: soro de leite humano pasteurizado; FDW: soro de leite humano liofilizado; SDW: soro de leite humano aplicado por *spray drying*; HHPW: soro de leite humano aplicado por alta pressão hidrostática; AGPI: ácido graxo poliinsaturado; AGS: ácido graxo saturado; n-6: ácido graxo do grupo ômega-6; n-3: ácido graxo do grupo ômega-3; LA: ácido linoleico; ALA: ácido  $\alpha$ -linolênico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; H/H: ácidos graxos hipocolesterolêmicos/hipercolesterolêmicos; IA: índice de aterogenicidade; IT: índice trombogênico; HPI: índice de promoção da saúde.

AGPI/AGS é o índice mais comumente utilizado para avaliar o valor nutricional dos alimentos, pois ele toma a hipótese que os AGPIs podem restringir o colesterol de lipoproteína de baixa densidade e diminuir os níveis de colesterol sérico, enquanto os AGSs mudam para níveis altos de colesterol sérico.<sup>50</sup> Técnicas de determinação estimulam a composição corporal comparando dietas com base na proporção AGPI/AGS e estão associadas ao gasto energético em repouso e/ou oxidação de gordura após a exposição a uma dieta rica em AGPI.<sup>51,52</sup> Existem valores estipulados para alimentos como algas (0,42-2,12), carnes (0,11-2,04), peixes (0,50-1,62), crustáceos (0,20-2,10) e produtos dietéticos (0,02-0,17), onde ambas as fontes mostram efeitos diferentes na saúde cardiovascular. No presente estudo, todas as amostras apresentaram diferenças significativas para o índice

AGPI/AGS, variando de  $0,14 \pm 0,00$  (CW) a  $0,47 \pm 0,02$  (PW), o que permite, portanto, que novas equações sejam usadas para avaliar o efeito da composição de ácidos graxos no colesterol.<sup>50</sup>

A razão n-6/n-3 não apresentou diferença estatística entre FDW e HHPW, e entre FDW e SDW, embora tenham apresentado diferenças estatísticas entre as demais amostras. O maior valor encontrado foi para CW ( $28,29 \pm 0,59$ ), enquanto na HHPW apresentou o menor valor ( $13,29 \pm 1,00$ ). A estimativa da razão n-6/n-3 é importante, pois compreende-se 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 para o funcionamento adequado do organismo. Além disso, a razão n-6/n-3 é importante para garantir o equilíbrio das atividades anti-inflamatórias (vinculadas ao n-3) e pró-inflamatória (vinculadas ao n-6).<sup>50</sup> Refere-se ao alto valor apresentado proveniente do ácido graxo da série n-6 (L, 18:2n-6) encontrado na composição dos ácidos graxos, sendo este um componente estrutural indispensável de certas ceramidas dérmicas com importância para a manutenção da barreira de água epidérmica.<sup>50,53</sup>

A relação linoleico/ $\alpha$ -linolênico (LA/ALA) é um guia associado à dieta, atuando como coadjuvante para manter sob condições normais o neurodesenvolvimento e a função cerebral.<sup>54</sup> Entre as amostras, houve variação de  $19,63 \pm 0,36$  (FDW) a  $42,55 \pm 2,36$  (CW). Entende-se que menores proporções são benéficas à saúde humana. Toro-Ramos *et al.*<sup>55</sup> identificaram uma proporção LA/ALA de 23:1 e elucidou que o excesso de LA pode competir pelas mesmas enzimas na dessaturase e elongase durante o metabolismo dos precursores de EPA e DHA, devido à competição na síntese de ALA. Van Der Westhuyzen *et al.*<sup>56</sup> identificaram um teor de LA/ALA de 40:1 no leite de lactantes com dieta tradicional de milho,<sup>57</sup> corroborando assim os resultados dos achados obtidos no presente estudo. No entanto, os padrões para fórmulas infantis estipulados pelo CODEX preveem uma relação

LA/ALA entre 5:1 e 15:1.<sup>58</sup> A proporção LA/ALA também é frequentemente elucidada como um influenciador do sistema imunológico, no entanto, Jensen *et al.*<sup>59</sup> recomendam estudos aprofundados dos efeitos das proporções LA/ALA no crescimento infantil, antes da adoção de qualquer indicação regimentada. Chen *et al.*<sup>50</sup> afirmam que a relação LA/ALA não tem impacto significativo no desenvolvimento dos tecidos durante a idade avançada, portanto, sugere-se permitir o uso de soro de leite humano processado durante a introdução alimentar, como suplemento alimentar para a infância.

Em relação aos resultados de EPA+DHA, as amostras PW, FDW e HHPW não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), com valores de  $0,55 \pm 0,05$ ,  $0,53 \pm 0,02$  e  $0,51 \pm 0,03$ , respectivamente. O maior valor encontrado foi na amostra PW ( $0,55 \pm 0,05$ ), enquanto o menor valor foi na CW ( $0,26 \pm 0,01$ ). Estudos afirmam que os ácidos graxos EPA e DHA desempenham funções no desenvolvimento das células nervosas e cerebrais, desde o período pré-natal até após o nascimento.<sup>54</sup> Embora não haja uma recomendação específica para a ingestão adequada de EPA para crianças de até seis meses de idade, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação<sup>60</sup> recomenda que a ingestão de EPA para crianças de 2 a 4 anos seja de 100 a 150 mg dia<sup>-1</sup>. Para bebês amamentados, é indicada uma ingestão de pelo menos 20 mg dia<sup>-1</sup> de DHA para atingir a quantidade acumulada no metabolismo.<sup>54</sup> Portanto, as amostras de soro de leite humano apresentaram esses ácidos graxos, onde seu consumo pode ser responsável por uma parcela da ingestão de EPA+DHA.

A proporção de ácidos graxos hipocolesterolêmicos/hipercolesterolêmicos (H/H) apresentou diferenças significativas entre as amostras, exceto para as amostras FDW e HHPW, que apresentaram similaridade estatística entre si ( $p > 0,05$ ). Entre elas, o maior resultado foi no PW ( $1,37 \pm 0,04$ ), enquanto o CW apresentou o menor ( $0,44 \pm 0,01$ ). Segundo Chen e Liu,<sup>50</sup> é necessário que o índice H/H tenha razões que variam de 0,32 a

1,29 para produtos lácteos. Evidências apontam que a razão H/H indica os efeitos específicos dos ácidos graxos no metabolismo do colesterol, portanto é sugerido que o aumento da razão H/H na porção lipídica do leite humano beneficie o organismo humano, uma vez que os ácidos graxos hipocolesterolêmicos atuam na redução da lipoproteína de baixa densidade, prevenindo doenças cardiovasculares.<sup>26</sup>

Outros achados relevantes restringem-se aos índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT), que se tornam mais apropriados para caracterizar estimativas do potencial aterogênico e trombogênico da dieta do que a relação AGPIs/AGSs, sugerindo que esses índices estão associados ao bloqueio das artérias.<sup>50</sup> Os principais grupos de ácidos graxos saturados estão relacionados aos pró-aterogênicos, que incluem 12:0, 14:0 e 16:0, pois são considerados favoráveis à adesão de lipídios aos sistemas circulatório e imunológico. No entanto, os ácidos graxos insaturados são apontados como antiaterogênicos, pois inibem o acúmulo de placa e reduzem os níveis de fosfolipídios e colesterol.<sup>51</sup> Em relação ao IT, a tendência de formar coágulos nos vasos sanguíneos é caracterizada e, portanto, as funções dos ácidos graxos antitrombogênicos (AGMI, grupos n-3 e n-6) contribuem entre os ácidos graxos pró-trombogênicos (12:0, 14:0, 16:0).<sup>27</sup>

Em vista disso, a redução do IA pode estar relacionada a um índice lipídico saudável, capaz de prevenir a incidência de doença coronariana, e está relacionada a índices lipídicos saudáveis.<sup>51</sup> O IA não apresentou diferença significativa entre FDW e HHPW, porém, todos os outros processamentos apresentaram diferença estatística. O maior valor encontrado foi relacionado ao CW ( $3,88 \pm 0,05$ ) e o menor valor ao PW ( $1,13 \pm 0,04$ ), em que, ao comparar as amostras, a quantificação de 12:0, 14:0, 16:0 foi maior na amostra CW, enquanto os  $\Sigma$ AGMI,  $\Sigma$ n-3,  $\Sigma$ n-6 foram maiores no PW, corroborando assim os resultados obtidos. O IA é um marcador eficiente para predizer o risco de doença cardiovascular, pois considera uma evidência disponível de ácidos graxos saturados específicos considerados

proaterogênicos.<sup>50</sup> Modificações no perfil lipídico do leite afetam conseqüentemente o valor do IA.<sup>61</sup> Chen e Liu<sup>50</sup> prescreveram variações de IA entre 1,42 a 5,13 para leite, havendo divergências entre diferentes espécies de mamíferas e estágios de lactação.

O índice de trombogenicidade (IT) apresentou diferença estatística em relação a todos os processamentos, sendo o maior valor na amostra CW ( $2,50 \pm 0,02$ ) e o menor na PW ( $1,21 \pm 0,03$ ). Balthazar *et al.*<sup>62</sup> obtiveram valores superiores, entre  $2,75 \pm 0,01$  a  $5,28 \pm 1,48$ , quais resultados os autores consideraram como saudáveis para consumo humano. A redução dos valores desses índices (IA e IT) é importante, pois ocorre tanto pela diminuição das concentrações dos ácidos graxos 12:0, 14:0 e 16:0 (aterogênicos e trombogênicos) quanto pelo aumento de AGMI e AGPI, considerados benéficos à saúde.

Os autores não encontraram evidências na literatura sobre valores de referência para consumo infantil de IA e TI, porém, segundo Santos-Silva *et al.*,<sup>26</sup> esses índices indicam o potencial de agregação plaquetária, portanto, níveis baixos são desejáveis, pois indicam uma qualidade alimentar lipídica e seus potenciais efeitos no desenvolvimento de doenças coronárias. Assim, a redução desses índices demonstra o potencial de aplicação do processamento para a qualidade nutricional mais adequada para a saúde, uma vez que dietas que incluem produtos cuja composição de ácidos graxos é menor que IA e IT podem auxiliar na redução do risco de doenças nas artérias coronárias devido à melhor qualidade nutricional desses produtos.<sup>62</sup>

O índice de promoção da saúde (HPI) proposto por Chen *et al.*<sup>28</sup> permite uma avaliação do valor nutricional lipídico que foca no efeito protetor da composição de ácidos graxos sobre doenças cardiovasculares, inversamente ao IA. Em pesquisas para produtos lácteos, os valores indicados variam de 0,16 a 0,68.<sup>50</sup> Foi possível observar no presente estudo que o HPI está entre  $0,26 \pm 0,00$  (CW) a  $0,88 \pm 0,03$  (PW), com diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), portanto, a amostra PW apresentou um valor acima do esperado.

Esse ocorrido pode ser justificado pela afirmação de Chen *et al.*,<sup>28</sup> que ressalta que o teor de poliinsaturados no perfil de produtos lácteos interfere na viscosidade, e a aplicação de temperatura provoca sua liberação, ou seja, quando consumido, diminui as concentrações plasmáticas de colesterol e promoverá a saúde humana. Nesse sentido, vale destacar que a amostra com maior valor encontrado (PW) teve temperatura de pasteurização aplicada de 62,5 °C, enquanto a amostra CW não foi submetida a nenhum tratamento.

Outro estudo relaciona ácidos graxos do leite em pó de búfala produzido por *spray drying* com aspectos tecnológicos, oxidação lipídica e conversão em ácidos graxos livres.<sup>63</sup> O HPI da amostra SDW ( $0,44 \pm 0,02$ ), aplicado *spray drying*, pode favorecer a degradação dos ácidos graxos, conseqüentemente esclarecendo o valor obtido na amostra. Enquanto as amostras FDW e HHPW não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), o que elucida a eficiência desses processamentos empregados, conforme demonstrado por Neia *et al.*<sup>18</sup> e Manin *et al.*,<sup>17</sup> que os indicam como alternativas viáveis para o tratamento do leite humano, mantendo adequada qualidade lipídica.

Barreto *et al.*<sup>64</sup> descrevem que a qualidade nutricional da fração lipídica composta por quantidades de 18:1n-9 e 18:2n-6 maiores que 18:0 e 16:0 corroboram as recomendações para humanos. As diferenças na composição de ácidos graxos e na qualidade nutricional lipídica entre as amostras podem ser justificadas pela aplicação individual dos processamentos realizados, modificando conseqüentemente seu perfil lipídico, uma vez que a fração lipídica é alterada.

## Concentração de citocinas IL-10 e TGF-β1

O conteúdo de citocinas IL-10 e TGF-β1 obtidos do soro de leite humano CW (não tratado), e após os processamentos de pasteurização, liofilização, *spray drying* e alta pressão hidrostática são descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Concentração de citocinas IL-10 e TGF-β1 em soro de leite humano não tratado (CW) e outros soros humanos aplicando diferentes processamentos

Citocinas	Amostras				
	CW	PW	FDW	SDW	HHPW
<b>IL-10</b>	1,65 ± 0,91 <sup>c</sup>	3,21 ± 0,92 <sup>bc</sup>	6,11 ± 0,40 <sup>ab</sup>	7,43 ± 1,67 <sup>a</sup>	8,09 ± 2,17 <sup>a</sup>
<b>TGF-β1</b>	413,70 ± 18,93 <sup>ab</sup>	461,42 ± 57,14 <sup>a</sup>	210,55 ± 12,34 <sup>d</sup>	311,44 ± 13,40 <sup>c</sup>	339,66 ± 4,45 <sup>bc</sup>

Resultados foram expressos como média ± desvio padrão de duplicatas. Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. CW: Soro de leite humano não tratado; PW: Soro de leite humano pasteurizado; FDW: Soro de leite humano liofilizado; SDW: Soro de leite humano aplicado por *spray drying*; HHPW: Soro de leite humano aplicado por alta pressão hidrostática.

Avaliar a influência dos processamentos na concentração de IL-10 e TGF-β1 torna-se interessante, pois são citocinas anti-inflamatórias indispensáveis detectadas em frações séricas.<sup>65</sup> Ao comparar os níveis de IL-10 nas amostras CW e após os processamentos, a amostra PW foi a única que permaneceu semelhante nos níveis de IL-10. Em contraste, as concentrações de IL 10 aumentaram para FDW ( $6,11 \pm 0,40 \text{ pg mL}^{-1}$ ), para SDW ( $7,43 \pm 1,67 \text{ pg mL}^{-1}$ ) e HHPW ( $8,09 \pm 2,17 \text{ pg mL}^{-1}$ ) quando comparado ao CW ( $1,65 \pm 0,91 \text{ pg mL}^{-1}$ ). Por outro lado, a concentração de TGF-β1 permaneceu semelhante entre o PW ( $461,42 \pm 57,14 \text{ pg mL}^{-1}$ ) e o CW ( $413,70 \pm 18,93 \text{ pg mL}^{-1}$ ) amostras ( $p > 0,05$ ). No entanto, os níveis de TGF-β1 diminuíram no FDW ( $210,55 \pm 12,34 \text{ pg mL}^{-1}$ ), SDW ( $311,44 \pm 13,40 \text{ pg mL}^{-1}$ ) e HHPW ( $339,66 \pm 4,45 \text{ pg mL}^{-1}$ ) amostras, quando comparadas com CW ( $413,70 \pm 18,93 \text{ pg mL}^{-1}$ ).

As citocinas são peptídeos multifuncionais solúveis, comumente presentes em picogramas no leite humano, e ainda assim atuam como fatores autócrinos-parácrinos ao se

ligarem a receptores celulares específicos, com funções do sistema imunológico.<sup>66</sup> Alguns fatores tornam-se relevantes para a manutenção dos níveis de citocinas, nomeadamente, as condições de armazenamento, como temperatura, ciclos de congelamento e descongelamento, pelo que a sua exposição às condições de manipulação e de processamento pode influenciar a estabilidade da estrutura da citocina.<sup>67</sup> Dessa forma, observou-se que os processamentos de secagem (liofilização e *spray drying*) foram adequados para manter a estrutura biológica e garantir as funções imunológicas na matriz do leite humano.

Ainda assim, visando os níveis de IL-10 (Tabela 4), Wesolowska *et al.*<sup>13</sup> associaram a preservação da atividade da citocina por alta pressão, pois o efeito protetor da tecnologia permanece intimamente dependente de interações intermoleculares, como a ligação de hidrogênio e a estrutura das proteínas que a matriz possui, ou seja, reforça os níveis de IL-10 definidos em HHPW. Untalan *et al.*<sup>68</sup> culminam em seu estudo que a pasteurização reduz a concentração de IL-10 em 66,67% no leite humano, enquanto no presente estudo quando comparado o PW aos outros métodos aplicados FDW, SDW e HHPW tiveram uma redução de 47,46 a 60,32%, além disso, o estudo complementa que a pasteurização também não afeta os níveis de TGF- $\beta$ 1, conforme encontrado no presente estudo.

Este é o primeiro estudo que avaliou citocinas em soro de leite humano processados por liofilização, *spray drying* e alta pressão hidrostática. Em geral, as citocinas são componentes fundamentais, pois são peptídeos multifuncionais que se ligam a receptores celulares e atuam no sistema imunológico.<sup>69</sup> Anteriormente, foi consolidado por diferentes autores que as citocinas do grupo IL são perceptíveis na fase aquosa do leite humano para IL-2, IL-4, IL-5 e IL-8.<sup>70,71</sup> Portanto, pode-se relatar que os níveis de citocinas encontrados após o processamento se tornaram altamente disponíveis para IL-10. Essa descoberta pode ser justificada porque o processamento está indiretamente relacionado à liberação de

proteína IL não ligada, tornando-a capaz de se ligar ao anticorpo IL espontaneamente no ensaio ELISA.<sup>72,73</sup>

Já era esperado que após a pasteurização o nível de TGF- $\beta$ 1 obtivesse um resultado superior, assim como observado pelo Riskin,<sup>74</sup> as concentrações de TGF- $\beta$ 1 são influenciadas pela liberação de compartimentos gordurosos ou celulares na fração aquosa, neste caso, que envolveu granulócitos macrófagos da matriz avaliada. A diminuição após a aplicação de spray drying corrobora as afirmações de Silva *et al.*,<sup>15</sup> que identificaram uma redução de 19% no rendimento de fatores de crescimento nas frações séricas do leite de vaca, além de definir a concentração de TGF- $\beta$  como intensamente dependente da integridade do conteúdo proteico.

As IL-10 e TGF- $\beta$ 1 são citocinas anti-inflamatórias que desempenham um papel fundamental na regulação da resposta imune de recém-nascidos. A IL-10 está envolvida na maturação de células do trato gastrointestinal, na regulação da inflamação intestinal e na tolerância de antígenos do microbioma intestinal do recém-nascido. No entanto, o TGF- $\beta$ 1 é uma citocina abundante no leite humano, ou seja, suas funções no organismo do recém-nascido são o controle do sistema imunológico e a estimulação do crescimento celular, especialmente do tecido conjuntivo e da cicatrização de feridas.<sup>65</sup> Assim, no presente estudo, os níveis de IL-10 em todas as amostras obtiveram níveis adequados, porém, o oposto foi observado em relação ao TGF- $\beta$ 1, embora a amostra PW seja a única amostra que apresentou vantagem sobre as demais, onde manteve concentrações de TGF- $\beta$ 1 semelhantes às CW.



apresentaram distância igual do centro do gráfico, evidenciando assim que as variáveis tiveram significância diferente no contexto de expressão do PCA. De forma geral, nota-se que os processamentos apresentaram divergências nos efeitos causados, e, além disso, a pasteurização e a liofilização foram a grande maioria semelhantes em termos de composição de ácidos graxos, e a alta pressão hidrostática influenciou a IL-10, enquanto nenhum tratamento se mostrou positivo para a manutenção do TGF- $\beta$ 1 por ser apenas distinguido no PCA para CW.

## **Conclusões**

No presente estudo foram avaliados processamentos com potencial para conservação de produtos lácteos, evidenciados pelo perfil lipídico dos triacilgliceróis e sua composição em ácidos graxos, os quais foram demonstrados pela influência na qualidade lipídica do produto após diferentes processamentos. Dentre os tratamentos empregados, ficou evidente que a alta pressão hidrostática e *spray drying* provocaram alterações significativas na configuração do perfil lipídico. Por outro lado, as demais técnicas apresentaram comportamento semelhante, preservando a maioria de seus constituintes lipídicos, considerados benéficos à saúde.

Em relação aos níveis de citocinas, todas as amostras foram adequadas para IL-10, com altas concentrações após o processamento; entretanto, sobre o TGF- $\beta$ 1, apenas a pasteurização apresentou vantagem sobre as demais, mantendo sua concentração.

Conseqüentemente, na PCA, observou-se que os efeitos da pasteurização e da liofilização foram semelhantes entre si em termos de composição de ácidos graxos. A alta pressão hidrostática é caracterizada por altas concentrações da citocina IL-10. No entanto, o *spray drying* diferiu dos outros processamentos em todos os aspectos avaliados, permanecendo singular apenas para TI.

Dadas as alterações investigadas na qualidade do soro de leite humano tratado, as aplicações de pasteurização e liofilização se apresentaram muito similaridades, além de serem geralmente adequadas. Nesse sentido, observou-se que após cada aplicação do processamento, características individuais foram apresentadas na conservação dos nutrientes, dessa forma, ao indicar o processamento para futuras aplicações, o interesse da qualidade buscada e o organismo individual de cada consumidor devem ser relevantes.

Em razão do exposto, o soro de leite humano processado pode ser promissor como produto complementar para introdução alimentar infantil, pois garante a conservação de seus nutrientes. Portanto, os achados deste estudo demonstram o potencial do soro de leite humano aplicado em diferentes processamentos, para utilização como produto complementar para introdução alimentar infantil, devido à garantia da qualidade de nutrientes essenciais para a nutrição infantil. Neste contexto, pesquisas sobre o impacto no perfil lipídico e nas citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ 1, ambos estudos são escassos na literatura e podem ser considerados como pontos de partida para estudos futuros que confirmem as hipóteses encontradas em nosso estudo.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) nº 88887.606273/2021-00, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FAPPR), Fundação Cargill e Programa Pesquisa para o SUS pela assistência financeira. Gostariam também de expressar sua gratidão ao Banco de Leite Humano do Hospital Universitário Regional de Maringá pela parceria e disponibilização de amostras de leite humano.

### **Contribuições dos autores**

Eloize S. Alves foi responsável pela conceituação, metodologia, curadoria de dados, análise formal, investigação, redação do rascunho original, revisão e edição; Matheus C. Castro pela metodologia, análise formal, redação do rascunho original; Bruno Henrique F. Saqueti pela investigação, visualização, redação do rascunho original; Luciana P. Manin pela metodologia; Josiane B. Alencar pela análise formal, curadoria de dados; Joana Maira V. Zacarias pela análise formal; Andressa Rafaella S. Bruni pela redação da revisão e edição; Grasielle S. Madrona pela redação da revisão e edição; Jeane E. L. Visentainer pela metodologia, recursos; Marcelo Cristianini pela visualização, recursos; Oscar Oliveira Santos pela supervisão, recursos; Jesui V. Visentainer pela supervisão, conceituação, aquisição de financiamento, recursos.

## Referências

1. Picaud, J.C.; Buffin, R.; *Clin. Perinatol.* **2017**, *44*, 95.  
[<https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.003>]
2. World Health Organization – Who; *Health topics. Breastfeeding: Recommendations*. Who: Geneva, 2021. [[https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab\\_2](https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab_2)], acessado October 2022.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa; *Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. Resolução da diretoria colegiada-RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006*. Diário Oficial da União: Brasília, Brazil, 2006.  
[[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2006/res0171\\_04\\_09\\_2006.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2006/res0171_04_09_2006.html)], acessado em Novembro 2022.
4. Castro, M.C.; Alves, E.S.; Saqueti, B.H.F.; Silveira, R.; Souza, P.M.; Chiavelli, L.U.R.; Visentainer, J.E.L.; Madrona, G.S.; Santos, O.O.; Visentainer, J.V.; *J. Food Meas. Charact.* **2022**, *16*, 3630. [<https://doi.org/10.1007/s11694-022-01441-y>]
5. Alves, E.S.; Castro, M.C.; Saqueti, B.H.; Manin, L.P.; Silveira, R.D.; Souza, P.M.; Santos, O.O.; Visentainer, J.V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2021**, *32*, 1884.  
[<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20210092>]
6. Mazzocchi, A.; D’Oria, V.; Cosmi, V.D.; Bettocchi, S.; Milani, G.P.; Silano, M. Agostoni, C.; *Nutrients* **2018**, *10*, 567. [<https://doi.org/10.3390/nu10050567>]
7. Tsermoula, P.; Khakimov, B.; Nielsen, J.H.; Engelsen, S.B.; *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *118*, 230. [<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.025>]
8. Gharbi, N.; Marciniak, A.; Perreault, V.; Stone, D.; Fittipaldi, N.; Unger, S.; Doyen, A.; *LWT* **2022**, *172*, 114184. [<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114184>]
9. Albarrán, J.C.; Hernández, R.E.N.; Pacheco, J.R.S.; Quiñones, I.C.S.; López, G.G.M.; Barrera de León, J.C.; Uscanga, B.R.A.; *Nutr. Hosp.* **2017**, *34*, 899.

[<https://doi.org/10.20960/nh.627>]

10. Delgado, F.J.; Cava, R.; Delgado, J.; Ramírez, R.; *Dairy Sci. Technol.* **2014**, *94*, 145. [<https://doi.org/10.1007/s13594-013-0149-y>]

11. Saqueti, B.H.; Alves, E.S.; Castro, M.C.; Santos, P.D.; Sinosaki, N.; Senes, C.E.; Visentainer, J.V.; Santos, O.O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2021**, *32*, 2009.

[<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20210096>]

12. Neia, V.J.C.; Zacarias, J.M.V.; Alencar, J.B.D.; Santos, P.D.S.D.; Tavares, C.B.G.; Paula, M.G.; Oliveira, M.M.; Nakamura, C.V.; Santos, O.O.; Visentainer, J.L.; Visentainer, J.V.; *Dry. Technol.* **2021**, *40*, 3149-3159.

[<https://doi.org/10.1080/07373937.2021.2005086>]

13. Wesolowska, A.; Sinkiewicz-Darol, E.; Barbarska, O.; Bernatowicz-Lojko, U.; Borszewska-Kornacka, M.K.; Van Goudoever, J. B.; *Nutrients* **2019**, *11*, 1169.

[<https://doi.org/10.3390/nu11051169>] a

14. Malafrente, L.; Ahrné, L.; Innings, F.; Jongasma, A.; Rasmuson, A.; *Chem. Eng. Res. Des.* **2015**, *104*, 703. [<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2015.10.011>]

15. Silva, F.L.; Carvalho, A.F.; Simeão, M.; Silva, C.R.; Silva, G.M.; Schuck, P.; Perrone, I.T.; *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 2065. [<https://doi.org/10.1007/s00217-017-2897-z>]

16. Joshi, S.; Mohapatra, A.; Singh, L.; Sahu, J.K.; In *Thermal Food Engineering Operations*; Kumar, N.; Panghal, A.; Garg, M.K., eds.; Scrivener Publishing: Beverly, USA, 2022, ch. 5. [<https://doi.org/10.1002/9781119776437.ch5>]

17. Manin, L.P.; Rydlewski, A.A.; Pizzo, J.S.; Cruz, V.H.M.; Alves, E.S.; Santos, P.D.S.; Mikcha, J.M.G.; Cristianini, M.; Santos, O.O.; Visentainer, J.V.; *J. Food Compost. Anal.* **2023**, *115*, 104918. [<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104918>]

18. Neia, V.J.; Santos, P.D.; Tavares, C.B.; Paula, M.G.; Costa, S.C.; Zacarias, J.M.;

- Alencar, J.B.; Silveira, R.; Santos, O.O.; Visentainer, J.L.; Visentainer, J.V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2023**, *34*, 54. [<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20220087>]
19. Manin, L.P.; Rydlewski, A.A.; Galuch, M.B.; Pizzo, J.S.; Zappiello, C.D.; Senes, C.E.R.; Santos, O.O.; Visentainer, J.V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, *30*, 1579. [<http://doi.org/10.21577/0103-5053.20190045>]
20. Castro-Albarrán, J.; Aguilar-Uscanga, B. R.; Calon, F.; St-Amour, I.; Solís-Pacheco, J.; Saucier, L.; Ratti, C.; *Dry. Technol.* **2016**, *34*, 1801. [<https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1141781>]
21. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H.A.; *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497. [[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)]
22. Silveira, R.; Vágula, J.M.; Lima Figueiredo, I.; Claus, T.; Galuch, M.B.; Junior, O.O.S.; Visentainer, J.V.; *Int. Food Res. J.* **2017**, *102*, 43-50. [<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.076>]
23. International Organization for Standardization – Iso; *Nº 12966 - Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters — Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids*. ISO: Geneva, 2017. [<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:12966:-2:ed-2:v1:en>], acessado em Outubro 2022.
24. Food and Agriculture Organization – Fao; Nutritional aspects of cardiovascular disease. In *Report of the Cardiovascular Review Group—Committee on Medical Aspects of Food Policy*. Department of Health: London, 1996. [<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9521379>] acessado em Novembro 2022.
25. Food Standards Australia New Zealand – FSANZ; *Is dietary intake of  $\alpha$ -linolenic (ALA) and linoleic acids (LA) together needed for normal growth and development in children?* 2016.

[<https://www.foodstandards.gov.au/consumer/labelling/nutrition/Documents/ALA%20LA.pdf>] acessado em Novembro 2022.

26. Santos-Silva, J.; Bessa, R.J.B.; Santos-Silva, F.J.L.P.S.; *Livest. Prod. Sci.* **2002**, 77, 187. [[https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00059-3)]

27. Ulbricht, T.L.V.; Southgate, D.A.T.; *Lancet* **1991**, 338, 985. [[https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M)]

28. Chen, S.; Bobe, G.; Zimmerman, S.; Hammond, E.G.; Luhman, C.M.; Boylston, T.D.; Freeman, A.E.; Beitz, D.C.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 3422. [<https://doi.org/10.1021/jf035193z>]

29. RStudio Team; *RStudio: Integrated Development for R*; RStudio, Boston, MA, USA, 2023.

30. Santos, P.D.S.; Silveira, R.; Reis, N.V.; Visentainer, J.V.; Santos, O.O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2018**, 29, 1645. [<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180036>]

31. Galuch, M.B.; Carbonera, F.; Magon, T.F.; Silveira, R.; Santos, P.D.; Pizzo, J.S.; Santos, O.O.; Visentainer, J.V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2018**, 29, 631. [<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170177>]

32. Pizzo, J.S.; Galuch, M.B.; Santos, P.D.; Manin, L.P.; Zappiello, C.D.; Silva, O.J.; Santos, O.O.; Visentainer, J.V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, 30, 1468. [<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190042>]

33. Manin, L.P.; Pizzo, J.S.; Rydlewski, A.A.; Santos, P.; Galuch, M.B.; Zappiello, C.D.; Santos, O.O. Visentainer, J.V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2021**, 32, 2086. [<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210101>]

34. Neia, V.J.C.; Santos, P.D.; Galuch, M.B.; Pizzo, J.S.; Ito, A.A.R.; Santos, O.O.; Visentainer, J.L. Visentainer, J.V.; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2019**, 121, 1800495. [<https://doi.org/10.1002/ejlt.201800495>]

35. Saqueti, B.H.F.; Alves, E.S.; Castro, M.C.; Ponhozi, I.B.; Silva, J.M.; Visentainer, J.V.; Santos, O.O.; *J. Food Meas. Charact.* **2022**, *16*, 2749.  
[<https://doi.org/10.1007/s11694-022-01370-w>]
36. Silveira, R.; Vágula, J.M.; Figueiredo, I.L.; Claus, T.; Galuch, M.B.; Junior, O.O.S.; Visentainer, J. V.; *Food Res. Int.* **2017**, *102*, 43.  
[<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.076>]
37. Rydlewski, A.A.; Manin, L.P.; Pizzo, J.S.; Silva, P.D.; Silveira, R.; Tavares, C.B.; de Paula, M. Santos, O.O.; Visentainer, J.V.; *J. Food Compost. Anal.* **2021**, *100*, 103797.  
[<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103797>]
38. Haddad, I.; Mozzon, M.; Strabbioli, R.; Natale G. Frega; *Dairy Sci. Technol.* **2012**, *92*, 37. [<https://doi.org/10.1007/s13594-011-0042-5>]
39. Visentainer, J.V.; Santos, O.O.; Maldaner L.; Zappiolo, C.; Neia, V.; Visentainer, L.; Pelissari, L.; Pizzo, J.; Rydlewski, A.; Silveira, R.; Galuch, M.; Visentainer, J.L. In *Biochemistry and Health Benefits of Fatty Acids*; Waisundara, V. Y.; Blumenberg, M., ed; IntechOpen: London, UK, 2018. [<https://doi.org/10.5772/intechopen.80429>]
40. Tu, A.; Ma, Q.; Bai, H.; Du, Z.; *Food Chem.* **2017**, *221*, 555.  
[<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.139>]
41. Mitsutake, H.; Gontijo, L.C.; Santana, F.B.; Guimarães, E.; Rocha, L.L.; Borges Neto, W.; *Rev. Virtual de Quím.* **2015**, *7*, 2180. [<https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150129>]
42. Wesolowska, A.; Brys, J.; Barbarska, O.; Strom, K.; Szymanska-Majchrzak, J.; Karzel, K.; Pawlikowska, E.; Zielinska, M.A.; Hamulka, J.; Oledzka, G.; *Nutrients* **2019**, *11*, 1972. [<https://doi.org/10.3390/nu11091972>] b
43. Gardner, A.S.; Rahman, I.A.; Lai, C.T.; Hepworth, A.; Trengove, N.; Hartmann, P.E.; Geddes, D.T.; *Nutrients* **2017**, *9*, 1. [<https://doi.org/10.3390/nu9091034>]

44. Demmelmair, H.; Koletzko, B.; *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2018**, *32*, 57. [<https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.11.002>]
45. Lepri, L.; Del Bubba, M.; Maggini, R.; Donzelli, G.P.; Galvan, P. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **1997**, *704*, 1. [[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00439-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00439-8)]
46. Mazalli, M.R.; Bragagnolo, N.; *Lipids* **2007**, *42*, 483.  
[<https://doi.org/10.1007/s11745-007-3046-4>]
47. Mueller, A.; Thijs, C.; Rist, L.; Simões-Wüst, A.P.; Huber, M.; Steinhart, H.; *Lipids* **2010**, *45*, 245. [<https://doi.org/10.1007/s11745-010-3390-7>]
48. Castro, M.C.; Oliveira, F.S.; Alves, E.S.; Zacarias, J.; Alencar, J.B.; Silva, J.M.D.; Visentainer, J.E.L.; Santos, O.O.; Visentainer, J.V.; Ichisato, S. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2023**, *34*, 201. [<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220099>]
49. Loor, J. J.; Ueda, K.; Ferlay, A.; Chilliard, Y.; Doreau, M.; *Anim. Feed Sci. Technol.* **2005**, *119*, 203. [<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.01.001>]
50. Rydlewski, A.A.; Silva, P.D.; Manin, L.P.; Tavares, C.B.; Paula, M.G.; Figueiredo, I.L.; Neia, V.B.M.J.C.; Santos, O.O.; Visentainer, J.V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, *30*, 1063. [<http://doi.org/10.21577/0103-5053.20190006>]
51. Chen, J.; Liu, H.; *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5695.  
[<https://doi.org/10.3390/ijms21165695>]
52. Monnard, C. R.; Dulloo, A. G.; *Obes. Rev.* **2021**, *22*, e13197.  
[<https://doi.org/10.1111/obr.13197>]
53. Zárata, R.; El Jaber-Vazdekis, N.; Tejera, N.; Pérez, J.A.; Rodríguez, C.; *Clin. Transl. Med.* **2017**, *6*, 1. [<https://doi.org/10.1186/s40169-017-0153-6>]
54. Koletzko, B.; Rodriguez-Palmero, M.; Demmelmair, H.; Fidler, N.; Jensen, R.; Sauerwald, T.; *Early Hum. Dev.* **2001**, *65*, 3. [[https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(01\)00204-3](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(01)00204-3)]

55. Khalid, W.; Gill, P.; Arshad, M.S.; Ali, A.; Ranjha, M.M.A.N.; Mukhtar, S.; Maqbool, Z.; *Int. J. Food Prop.* **2022**, *25*, 1021.  
[<https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2070642>]
56. Toro-Ramos, T.; Méio, M.D.B.B.; Morsch, D.S.; Moreira, M.E.L.; Carmo, M.D.G.T.D.; Sichieri, R.; Hoffman, D.J.; *J. Hum. Growth Dev.* **2013**, *23*, 270.  
[<http://pepsic.bvsalud.org/pdf/rbcdh/v23n3/03.pdf>].
57. Van Der Westhuyzen, J.; Chetty, N.; Atkinson, P.M.; *Eur. J. Clin. Nutr.* **1988**, *42*, 213. [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3383825/>]
58. Sauerwald, T.U.; Demmelmair, H.; Koletzko, B.; *Lipids* **2001**, *36*, 991.  
[<https://doi.org/10.1007/s11745-001-0810-9>]
59. Food and Agriculture Organization – Fao; *Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants (CODEX Stan 72–1981)*, Department of Health: London, 1981. [[https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B72-1981%252FCXS\\_072e.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B72-1981%252FCXS_072e.pdf)] acessado em Novembro 2022.
60. Jensen, C.L.; Prager, T.C.; Fraley, J.K.; Chen, H.; Anderson, R.E.; Heird, W.C.; *J. Pediatr.* **1997**, *131*, 200. [[https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(97\)70154-9](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(97)70154-9)]
61. Food and Agriculture Organization – Fao; *Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an expert consultation*. Rome: Research and Extension - FAO, 2010.  
[<https://www.fao.org/3/i1953e/I1953E.pdf>] acessado em Novembro 2022.
62. Balthazar, C.F.; Júnior, C.C.; Moraes, J.; Costa, M.P.; Raices, R.S.L.; Franco, R.M.; Cruz, A.G.; Silva, A.C.O.; *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 4160.  
[<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10072>]

63. Dauber, C.; Carreras, T.; Britos, A.; Carro, S.; Cajarville, C.; Gámbaro, A.; Vieitez, I.; *Small Rumin. Res.* **2021**, *199*, 106379.  
[<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106379>]
64. Sert, D.; Mercan, E.; Kılınç, M.; *Int. Dairy J.* **2022**, *135*, 105474.  
[<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105474>]
65. Barreto, Í.M.L.G.; Rangel, A.H.D.N.; Urbano, S.A.; Bezerra J.D.S.; Oliveira, C.A.A.; *Food Sci. Technol.* **2019**, *39*, 1. [<https://doi.org/10.1590/fst.11218>]
66. Dawod, B.; Marshall, J.S.; *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 16,  
[<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00016>]
67. Boudry, G.; Charton, E.; Le Huerou-Luron, I.; Ferret-Bernard, S.; Le Gall, S.; Even, S.; Blat, S.; *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 629740.  
[<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.629740>]
68. Keustermans, G.C.; Hoeks, S.B.; Meerding, J.M.; Prakken, B.J.; Jager, W.; *Methods* **2013**, *61*, 10. [<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.04.005>]
69. Untalan, P.B.; Keeney, S.E.; Palkowetz, K.H.; Rivera, A.; Goldman, A.S.; *Breastfeed. Med.* **2009**, *4*, 137. [<https://doi.org/10.1089/bfm.2008.0145>]
70. Ramírez, R.; Garrido, M.; Rocha-Pimienta, J.; García-Parra, J.; Delgado-Adámez, J.; *Food Chem.* **2021**, *343*, 128546. [<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128546>]
71. Agarwal, S.; Karmaus, W.; Davis, S.; Gangur, V.; *J. Hum. Lact.* **2011**, *27*, 171.  
[<https://doi.org/10.1177/0890334410395761>]
72. Bryan, D.L.; Forsyth, K.D.; Gibson, R.A.; Hawkes, J.S.; *Cytokine* **2006**, *33*, 293.  
[<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2006.02.009>]
73. Daniels, B.; Schmidt, S.; King, T.; Israel-Ballard, K.; Amundson Mansen, K.; Coutsoudis, A.; *Nutrients* **2017**, *9*, 178. [<https://doi.org/10.3390/nu9020178>]
74. Ewaschuk, J.B.; Unger, S.; O'connor, D.L.; Stone, D.; Harvey, S.; Clandinin,

M.T.; Field, C.J.; *Am. J. Perinatol.* **2011**, *31*, 593. [<https://doi.org/10.1038/jp.2010.209>]

75. Riskin, A.; *Breastfeed. Med.* **2020**, *15*, 563.

[<https://doi.org/10.1089/bfm.2020.0192>]