

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Cristine Couto de Almeida

**AVALIAÇÃO DE FÓRMULAS INFANTIS PARA LACTENTES E DE
SEGUIMENTO PARA LACTENTES: QUALIDADE NUTRICIONAL DE
PROTEÍNAS E MINERAIS, CONFORMIDADE DE SEUS RÓTULOS E A
PRESENÇA DE METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS**

Rio de Janeiro

2021

Cristine Couto de Almeida

**AVALIAÇÃO DE FÓRMULAS INFANTIS PARA LACTENTES E DE
SEGUIMENTO PARA LACTENTES: QUALIDADE NUTRICIONAL DE
PROTEÍNAS E MINERAIS, CONFORMIDADE DE SEUS RÓTULOS E A
PRESENÇA DE METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de
Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação
Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção
do título de Doutora em Ciências.

Orientadores: Kátia Christina Leandro e Carlos
Adam Conte Junior
Coorientadores: Marion Pereira da Costa e Diego dos
Santos Baião

Rio de Janeiro

2021

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Almeida, Cristine Couto de

Avaliação de fórmulas infantis para lactentes e de seguimento para lactentes: qualidade nutricional de proteínas e minerais, conformidade de seus rótulos e a presença de metais potencialmente tóxicos. / Cristine Couto de Almeida – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2021.

216 f. : il., tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2021.

Orientadores: Kátia Christina Leandro e Carlos Adam Conte Junior.

Coorientadores: Marion Pereira da Costa e Diego dos Santos Baião.

1. Fórmulas Infantis - análise. 2. Alimentos Infantis - toxicidade. 3. Análise de Alimentos - métodos. 4. Rotulagem Nutricional. 5. Vigilância Sanitária. I. Título.

Assessment of starting infant formulas and follow-up infant formulas for children: nutritional quality of proteins and essential minerals, conformity of their labels, and the presence of potentially toxic metals.

Cristine Couto de Almeida

**AVALIAÇÃO DE FÓRMULAS INFANTIS PARA LACTENTES E DE
SEGUIMENTO PARA LACTENTES: QUALIDADE NUTRICIONAL DE
PROTEÍNAS E MINERAIS, CONFORMIDADE DE SEUS RÓTULOS E A
PRESENÇA DE METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de
Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação
Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção
do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em 30/09/2021

BANCA EXAMINADORA

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

Vânia Margaret Paschoalin (Doutora)
Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ/UFRJ)

Sergio Borges Mano (Doutor)
Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal Fluminense (FMV/UFF)

Katia Christina Leandro (Doutora) – Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

Carlos Adam Conte Junior (Doutor) – Orientador
Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ/UFRJ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Ao meu filho, Breno, por seu amor incondicional, e por compreender minha ausência em muitos momentos e por me perdoar por todas as vezes que precisei ser rude com ele para que ele me deixasse focar no trabalho. Você ainda não entende, mas tudo isto é por você e para você!

A uma pessoa em especial que merece aqui meu reconhecimento, meu marido Bernardo. Companheiro, conselheiro e ouvinte, ele é tudo isso e muito mais em minha vida. Meu amor, obrigada por estar sempre comigo me apoiando e tolerando meus lapsos de loucura. Esta conquista também é sua!

Aos meus pais, Maria Lucinda e Nélio, que me guiaram e me educaram sempre para o meu melhor. A eles eu devo todas as vitórias desta vida, pois eles são a maior razão para eu me olhar no espelho hoje e preencher o coração de gratidão. Sou o reflexo do amor e esforço deles. Minha eterna gratidão por tudo!

Aos meus irmãos Priscila e Bruno, pela amizade, companheirismo e pelo apoio em todos os momentos. Obrigada pelos lindos sobrinhos!

Com carinho especial, quero agradecer ao professor Dr. Carlos Adam Conte Junior, a oportunidade de tê-lo como orientador do estágio de Conclusão do curso de Medicina Veterinária, Mestrado e agora Doutorado. Tenho muito orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço por todos os ensinamentos, pela atenção, conselhos e paciência. Saiba que você inspira profissionalmente todos àqueles que têm a oportunidade de estar próximo a você, por toda sua dedicação e amor à ciência.

À professora Dra. Kátia Christina Leandro, por abrir as portas de uma instituição de grande renome como a Fundação Oswaldo Cruz e por sua orientação, amizade e por ter esse grande coração disposto a acolher com tanto carinho seus alunos.

À professora Dra. Marion Pereira da Costa, por sua coorientação e amizade e por ser essa extraordinária cientista e a mais nova fonte de inspiração profissional aos novos alunos.

Ao Dr. Diego dos Santos Baião pela coorientação, pelos momentos de companheirismo e por todo apoio nas análises e nos resultados. Sua ajuda foi crucial na conclusão desta tese!

Ao Dr. André Luís Mazzei por todo apoio nas análises e pelos momentos de aprendizagem, vindo de um profissional tão brilhante e apaixonado pelo que faz.

À professora Dra. Vania Paschoalin pela contribuição nos artigos científicos.

À professora Dra. Rachel Ann Hauser-Davis, que possibilitou a utilização do ICP-MS para análise das amostras e pela contribuição nos artigos científicos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro.

Considero-me uma pessoa abençoada por ter a oportunidade de contar com todos vocês para a concretização desta conquista, uma realização pessoal e profissional.

De coração leve, minha gratidão e meus agradecimentos!

Perseverança é a firmeza ou constância num sentimento, numa resolução, num trabalho, apesar das dificuldades e dos incômodos.

Jean de Courberive

O sucesso da amamentação não é só uma responsabilidade da mulher – a promoção da amamentação é uma responsabilidade social coletiva.

UNICEF

RESUMO

As fórmulas infantis são recomendadas como um substituto ou complemento do aleitamento materno quando este não é possível ou recomendado. Esses produtos, em sua maioria, são produzidos a partir do leite de vaca modificado para atender às necessidades nutricionais de cada faixa etária. Levando em consideração que a nutrição infantil adequada é fundamental para o crescimento, desenvolvimento e saúde, é fundamental que a qualidade das fórmulas infantis seja avaliada constantemente. Além dos nutrientes, as fórmulas infantis podem conter substâncias nocivas, como metais tóxicos, geralmente presentes, devido à possível contaminação da matéria-prima ou no decorrer do processo tecnológico de fabricação. Ante o exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade nutricional de proteínas e minerais presentes em 30 amostras de fórmulas infantis para lactentes e de seguimento para lactentes comercializadas no Brasil. Adicionalmente foram identificadas e quantificadas proteínas bioativas (α -La e Lf), bem como a conformidade dos rótulos frente à legislação brasileira. Em paralelo, foi investigada a presença de metais tóxicos (Hg, As, Cd, Pb, Al, Sn e U). De forma geral, neste estudo, métodos quantitativos e qualitativos foram utilizados para determinar a qualidade nutricional das fórmulas infantis. O conteúdo total de proteínas foi estimado a fim de avaliar se o mesmo estava de acordo com os limites estabelecidos pela legislação vigente. O perfil proteico foi determinado por eletroforese (SDS-PAGE) para identificação das proteínas lácteas majoritárias e bioativas. As proteínas identificadas foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). O valor biológico das proteínas foi expresso através da digestibilidade *in vitro*, pela composição de aminoácidos essenciais e pelo escore químico de aminoácido corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS). O conteúdo de minerais essenciais e metais tóxicos foi avaliado por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Dentre as fórmulas infantis avaliadas, a maioria se encontrava de acordo com a legislação quanto ao conteúdo de proteínas, bem como para o conteúdo de minerais essenciais, atendendo às recomendações diárias. Ao comparar com o leite de vaca integral em pó observou-se que o conteúdo proteico foi o dobro do encontrado nas fórmulas infantis. A eletroforese identificou as principais proteínas lácteas (β -Lg, α -CN, β -CN, κ -CN, Lf e α -La), sendo que o β -Lg e as caseínas foram as frações com maiores concentrações quando analisadas por CLAE-DAD. Ao avaliar o valor biológico, todas tiveram boa digestibilidade, foram identificados todos os aminoácidos essenciais, porém ao comparar com os valores de referência, a maioria dos aminoácidos foi

limitante, uma vez que tiveram PDCAAS abaixo de 1,0. A maior preocupação em relação às informações veiculadas nos rótulos foi a falta da descrição correta sobre o tipo de leite utilizado na sua elaboração. Quanto aos metais tóxicos, apesar das formulações se mostrarem seguras em termo de Hg, As, Cd, Pb e U, a maioria delas apresentou conteúdo elevado de Al e Sn, indicando um possível risco de toxicidade ao lactente. Os resultados do presente estudo destacam a necessidade de ampliar a fiscalização das fórmulas infantis no que diz respeito à qualidade nutricional, informações de rotulagem e contaminação por metais tóxicos.

Palavras-chave: Aminoácidos essenciais. Bioacessibilidade. Caseínas. CLAE. Escore químico de aminoácidos. ICP-MS. Lactoferrina. Metais tóxicos. Minerais. PDCAAS. Rotulagem. SDS-PAGE. α -lactalbumina. β -lactoglobulina.

ABSTRACT

The use of infant formula is recommended to substitute or complement breastfeeding when this is not possible or recommended. These products are mainly produced from modified cow's milk to meet the nutritional needs of each age group. Considering that proper infant nutrition is critical to growth, development, and health, the quality of infant formula must be constantly evaluated. In addition to nutrients, infant formula can contain harmful substances, such as toxic metals, usually present due to possible contamination of the raw material or during the manufacturing process. Given the above, this study aimed to evaluate the nutritional quality of proteins and minerals present in 30 samples of infant formulas for infants and follow-up formulas for infants marketed in Brazil. Additionally, proteins with bioactive characteristics (α -La and Lf) were identified and quantified and evaluated the conformity of the labels with the Brazilian legislation. In parallel, the presence of potentially toxic elements (Hg, As, Cd, Pb, Al, Sn, and U) was investigated. In general, in this study, quantitative and qualitative methods were used to determine the nutritional quality of infant formulas. The total protein content was estimated to assess whether it was under the minimum and maximum limits established by current legislation. The protein profile was verified by electrophoresis (SDS-PAGE) to identify major and bioactive milk proteins. The identified proteins were separated and quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC). The nutritional quality of proteins was expressed through *in vitro* digestibility, essential amino acid composition, and protein digestibility-corrected chemical amino acid score (PDCAAS). While the content of essential minerals and toxic metals were analyzed by an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS). Among the brands evaluated, most were in accordance with Brazilian legislation regarding protein content and the content of essential minerals, meeting daily recommendations. When comparing with powdered whole cow's milk, it was observed that the protein content was twice that found in infant formulas. Electrophoresis identified the main milk proteins (β -Lg, α -CN, β -CN, κ -CN, Lf and α -La), and β -Lg and caseins were the fractions with the highest concentrations when analyzed by HPLC. When evaluating the protein quality, all had good digestibility, all essential amino acids were identified, but when comparing with reference values, most amino acids were limiting in infant formulas, as they had PDCAAS below 1.0. The biggest concern regarding the information provided on the label of infant formulas was the lack of an accurate description of the type of milk used in their preparation. As for toxic metals, despite the formulations being safe in terms of mercury, arsenic, cadmium,

lead, and uranium, most of them were contaminated by aluminum and tin, indicating a risk of toxicity to the infant. The present study results highlight the need to expand the inspection of infant formula concerning nutritional quality, labeling information, and toxic metals contamination.

Keywords: Amino acid score. Bioaccessibility. Caseins. Essential amino acids. HPLC. ICP-MS. Labelling. Lactoferrin. Minerals. PDCAAS. SDS-PAGE. Toxic metals. α -lactalbumin. β -lactoglobulin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Taxa de aleitamento materno exclusivo por país	27
Figura 2	Composição do leite materno ao longo da lactação	28
Figura 3	Percentual das frações proteicas presentes no leite de vaca e leite materno ...	31
Figura 4	Estrutura química da lactose	35
Figura 5	Propriedades funcionais das proteínas do leite humano	49
Figura 6	Fluxograma da produção de fórmulas infantis em pó	71
Figura 7	Possíveis fontes e vias de contaminação ao longo da cadeia de produção das fórmulas infantis	72
Figura 8	Desenho experimental com as metodologias utilizadas para cada análise	83
Figura 9	Etapa de diluição para estimar a concentração das proteínas nas amostras por espectrofotômetro	88
Figura 10	Etapas da montagem da cuba menor	88
Figura 11	Ilustração da corrida eletroforética	90
Figura 12	Ilustração da revelação do gel	91
Figura 13	Preparo da amostra para extração das proteínas	93
Figura 14	Preparo dos padrões de aminoácidos e corrida cromatográfica ilustrando a identificação de cada padrão	97
Figura 15	Hidrólise ácida das proteínas	98
Figura 16	Cromatógrafo líquido ultimate 3000	99
Figura 17	Etapa da incubação na Fase Gastrointestinal	103
Figura 18	Extração dos minerais e metais com ácido nítrico e posterior aquecimento à 100°C	105
Figura 19	ICP-MS NexIon 300x	106
Figura 20	Conteúdo médio total de proteínas (g/100 g) do LV integral e das diferentes marcas de FIs de fase 1 e fase 2	117
Figura 21	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das diferentes marcas de FIs e seus lotes	118
Figura 22	Gráficos representando a porcentagem aproximada das frações identificadas nos géis das diferentes marcas de FIs	119

Figura 23	Cromatograma representativo de uma mistura de padrões de proteína do leite bovino e lactoferrina (A) e cromatograma da análise das frações proteicas presentes em uma das amostra de FIs (B) 120
Figura 24	Curva padrão das frações de proteínas do leite de vaca identificadas por CLAE-DAD121
Figura 25	Gráfico comparativos entre as FIs de fase 1 e entre as FIs de fase 2 123
Figura 26	Cromatograma de uma mistura de padrões de aminoácidos essenciais interposto em um cromatograma de uma das FIs 127
Figura 27	Percentual dos valores da digestibilidade proteica <i>in vitro</i> (IVPD%) das FIs de fase 1 e de fase 2 129
Figura 28	Níveis de ingestão superior toleráveis (UL) para crianças de 0 a 12 meses e os valores de ingestão diária média calculado para as FIs de fase 1 e de fase 2 para o Fe, Zn e Se 140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativas das necessidades de aminoácidos essenciais para lactentes de 0 a 6 meses e lactentes de 7 a 12 meses, baseando-se nas concentrações observadas no leite materno	34
Tabela 2 – Composição de ácidos graxos no leite humano e no leite de vaca	39
Tabela 3 – Teor de vitaminas no leite humano e no leite de vaca, e o valores recomendado para consumo.....	40
Tabela 4 – Teor de macro e microminerais no leite materno e no leite de vaca, e os valores recomendados para consumo.....	47
Tabela 5 – Proteínas do leite humano associadas à sua função biológica	52
Tabela 6 – Níveis mínimos e máximos de nutrientes em 100 kcal recomendados por especialistas (ESPGHAN), e os níveis nutricionais descritos na legislação brasileira vigente que as fórmulas infantis destinadas à lactentes (Fase 1) e fórmulas infantis de seguimento destinadas para lactentes (Fase 2)	65
Tabela 7 – Limites máximos tolerados (LMT) dos contaminantes arsênio, cádmio, chumbo e estanho em alimentos infantis e dose oral de referência (RfD) para os metais tóxicos definidos por diferentes entidades públicas	75
Tabela 8 – Código das fórmulas infantis e seus lotes	84
Tabela 9 – Preparação dos géis de separação e empilhamento	89
Tabela 10 – Alíquotas utilizadas na adição padrão	100
Tabela 11 – Concentrações da adição padrão	101
Tabela 12 – Parâmetros Operacionais do ICP-MS NexIon 300x	106
Tabela 13 – Recomendações de consumo diário descritos nos rótulos das amostras para cada faixa etária	108
Tabela 14 – <i>Check-List</i> baseada nas RDCs n° 43/2011 e n° 45/2011	109
Tabela 15 – Conteúdo total de proteínas (g/100 g) das diferentes marcas e seus lotes de FIs de fase 1 e FIs de fase 2 e as informações do conteúdo de proteínas expressas nos rótulos	115
Tabela 16 – Concentração das proteínas majoritárias nas FIs de fase 1, FIs de fase 2 e do leite de vaca integral	122
Tabela 17 – Concentrações médias das frações proteicas dos diferentes lotes de FIs de fase 1 e FIs de fase 2	124

Tabela 18 – Concentração média dos aminoácidos essenciais das FIs de fase 1 e de fase 2 analisadas	127
Tabela 19 – Valores de aminoácidos em 100 kcal das FIs de Fase 1 e Fase 2 e no leite materno	128
Tabela 20 – Escore químico de aminoácidos (AAS) de FIs de fase 1 e fase 2 calculadas para crianças de 0 a 1 ano de idade	131
Tabela 21 – Escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS) de FIs de fase 1 e fase 2	132
Tabela 22 – Resultado da análise e os valores certificados dos elementos presentes nos dois materiais de referência (Skimmed Milk Powder ERM®-BD150 e Non-Fat Milk Powder 1549) e o percentual de recuperação	136
Tabela 23 – Concentrações dos minerais (mg/100g) nas FIs de fase 1 e nas FIs de fase 2 ..	137
Tabela 24 – Concentração média dos minerais nos três lotes de FIs de fase 1 e fase 2	138
Tabela 25 – Concentrações dos minerais estudados em 100 kcal das FIs de fase 1 e fase 2, e os valores referente as informações do rótulo	142
Tabela 26 – Concentração dos metais tóxicos nas FIs de fase 1 e fase 2 e o limite de quantificação daqueles no qual não foi possível quantificar	143
Tabela 27 – Concentrações de metais tóxicos nas FIs de fase 1 e de fase 2	144
Tabela 28 – Concentrações de metais potencialmente tóxicos dos lotes de FIs de fase 1 e FIs de fase 2	145
Tabela 29 – Quociente de risco de exposição à metais tóxicos nos lotes de FIs de fase 1 e nos lotes de FIs de fase 2 destinados a crianças de 7 a 12 meses	146
Tabela 30 – Percentual de conformidades das rotulagens	148

LISTA DE SIGLAS

AAS	Escore Químico de Aminoácidos
AG	Ácidos Graxos
ALA	α -linolênico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Soroalbumina
BSSL	Lipase Estimulada pelo Sal Biliar
CNs	Caseínas
CODEX	Codex Alimentarius
CPPs	Caseína fosfopeptídeos
DAO	Diamina Oxidase
DHA	Ácido Docosahexaenoico
EAR	<i>Estimated Average Requirement</i> , Necessidade Média Estimada
EDF	Equivalentes Dietéticos do Folato
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
ESPGHAN	Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Agência Americana para Alimentos e Medicamentos
FIs	Fórmulas Infantis
FOS	Fruto-oligossacarídeos
GMP	Glicomacropéptido
GOS	Galacto-oligossacarídeos
HMOs	<i>Human Milk Oligosaccharides</i> , Oligossacarídeos do Leite Humano
IA	Ingestão Adequada
Igs	Imunoglobulinas
IgAS	Imunoglobulina A secretora
IVPD	Digestibilidade <i>in vitro</i>
LA	Ácido linoléico
LC-PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa
Lf	Lactoferrina
LM	Leite Materno
LPO	Lactoperoxidase
LV	Leite de Vaca
Lz	Lisozima
MDA	Malondialdeído
MFGM	Membrana do Glóbulo de Gordura
MS	Ministério da Saúde do Brasil
NPR	Razão Proteica Líquida
NPU	Utilização Proteica Líquida
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPN	Osteopontina
PAO	Poliamina Oxidase
PD	Digestibilidade Proteica
PDCAAS	Escore Químico de Aminoácidos Corrigido pela Digestibilidade proteica
PDX	Polidextrose
PER	Eficiência Proteica

PUFAs	Ácidos Graxos Poliinsaturados de Cadeia Longa
RfD	Dose de Referência
THF	Tetraidrofolato
UL	<i>Tolerable Upper Intake Level</i> , Nível de Ingestão Superior Tolerável
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
α -La	α -Lactoalbumina
β -La	β -Lactoglobulina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Referencial teórico	26
1.1.1 Leite materno	26
1.1.2 Composição do leite materno vs fórmulas infantis elaborada a partir de leite de vaca .	29
1.1.2.1 <i>Proteínas</i>	29
1.1.2.2 <i>Carboidratos</i>	34
1.1.2.3 <i>Lipídeos</i>	36
1.1.2.4 <i>Vitaminas</i>	39
1.1.2.5 <i>Minerais e oligoelementos</i>	43
1.1.3 Compostos bioativos no leite materno e no leite de vaca	48
1.1.3.1 <i>Compostos bioativos derivados das proteínas</i>	49
1.1.3.2 <i>Compostos bioativos derivados dos aminoácidos</i>	53
1.1.3.3 <i>Compostos bioativos derivados das vitaminas</i>	54
1.1.3.4 <i>Membrana do glóbulo de gordura do leite</i>	56
1.1.3.5 <i>Compostos bioativos derivados dos lipídeos</i>	58
1.1.3.6 <i>Compostos bioativos derivados dos carboidratos</i>	59
1.1.4 Fórmulas infantis	61
1.1.4.1 <i>Tecnologia e produção na elaboração de fórmulas infantis</i>	70
1.1.5 Metais potencialmente tóxicos e seu potencial risco a saúde do lactente	71
1.1.6 Avaliação da qualidade proteica em alimentos	76
1.2 Justificativa	78
2 OBJETIVOS	80
2.1 Objetivo geral	80
2.2 Objetivos específicos	80
3 MATERIAL E MÉTODOS	82
3.1 Seleção das amostras	83
3.2 Conteúdo total de proteínas	84
3.2.1 Digestão da amostra	85
3.2.2 Destilação da amostra	85
3.2.3 Titulação	86
3.2.4 Cálculo para obtenção do teor de proteína	86

3.3 Perfil proteico	86
3.3.1 Preparo das amostras para análise pelo método SDS-PAGE	87
3.3.2 Concentração aproximada de proteína nas amostras	87
3.3.3 Preparo dos géis	88
3.3.4 Aplicação das amostras e corrida eletroforética	89
3.3.5 Revelação dos géis	90
3.3.6 Fotodocumentação e análise das imagens	91
3.4 Identificação e quantificação das proteínas majoritárias	91
3.4.1 Preparo dos padrões	92
3.4.2 Preparação das amostras	92
3.4.3 Equipamento	93
3.4.4 Condições cromatográficas	93
3.4.5 Determinação de parâmetros para validação dos métodos utilizados	94
3.4.5.1 <i>Linearidade e faixa linear</i>	94
3.4.5.2 <i>Repetibilidade</i>	95
3.4.5.3 <i>Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)</i>	95
3.5 Identificação e quantificação dos aminoácidos essenciais por CLAE-CAD	96
3.5.1 Preparo dos padrões	96
3.5.2 Preparação das amostras	97
3.5.3 Equipamento	98
3.5.4 Condições cromatográficas	99
3.5.5 Quantificação dos aminoácidos na amostra	99
3.6 Valor biológico das proteínas	101
3.6.1 Bioacessibilidade (IVPD%)	101
3.6.1.1 <i>Material e reagente necessários</i>	102
3.6.1.2 <i>Fase Gástrica</i>	102
3.6.1.3 <i>Fase Intestinal</i>	103
3.6.1.4 <i>Bioacessibilidade (IVPD%)</i>	104
3.6.2 Escore químico de aminoácidos (AAS) e escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS)	104
3.7 Análise de minerais essenciais e metais potencialmente tóxicos	104
3.7.1 Preparo das amostras	105
3.7.2 Equipamento	105

3.7.3 Condições operacionais e exatidão do método	106
3.7.4 Concentrações dos metais nas amostras	106
3.7.5 Exatidão do método analítico	107
3.7.6 Cálculo estimado da ingestão diária	107
3.7.7 Avaliação da exposição de lactentes a metais potencialmente tóxicos	108
3.8 Conformidade da rotulagem	109
3.9 Análise estatística	114
4 RESULTADOS	115
4.1 Conteúdo total de proteínas	115
4.2 Determinação e quantificação das frações proteicas majoritárias	117
4.2.1 Perfil proteico e abundância relativa	117
4.2.2 Identificação e quantificação das proteínas majoritárias	120
4.3 Determinação e quantificação dos aminoácidos essenciais	125
4.4 Avaliação biológica das proteínas	128
4.4.1 Bioacessibilidade (IVPD%)	128
4.4.2 Escore químico de aminoácidos (AAS) e escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS)	129
4.5 Análise de minerais essenciais e metais potencialmente tóxicos nas FIs	133
4.5.1 Exatidão do método analítico utilizado	133
4.5.2 Conteúdo de minerais essenciais nas FIs	134
4.5.3 Avaliação do potencial risco da presença de metais tóxicos nas FIs	143
4.6 Conformidade da rotulagem	147
5 DISCUSSÃO	150
5.1 Avaliação da qualidade proteica das FIs	150
5.2 Análise de minerais essenciais e metais potencialmente tóxicos em FIs	162
5.2.1 Minerais essenciais	162
5.2.2 Metais potencialmente tóxicos nas FIs	166
5.3 Conformidade da rotulagem das FIs	169
6 CONCLUSÃO	173
REFERÊNCIAS	177
APÊNDICE A - CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS (mg.g ptn⁻¹) DAS FIS DE FASE 1 E FASE 2	205

APÊNDICE B - VALORES OBTIDOS PELO CÁLCULO DA INGESTÃO DIÁRIA ESTIMADA PARA OS MINERAIS ESSENCIAIS DAS FIS DE FASE 1 E FASE 2 E OS VALORES RECOMENDADOS (EAR) PARA CONSUMO	206
APÊNDICE C - VALORES DE MACRONUTRIENTES EM 100 kcal EXPRESSOS NOS RÓTULOS DAS FIS DE FASE 1 E FASE 2	207
APÊNDICE D - VALORES DE INGREDIENTES OPCIONAIS EM 100 Kcal EXPRESSOS NOS RÓTULOS DAS FIS DE FASE 1 E FASE 2	208
APÊNDICE E - VALORES DE MICRONUTRIENTES EM 100 kcal EXPRESSOS NOS RÓTULOS AS FIS DE FASE 1 E FASE 2	209

1 INTRODUÇÃO

A alimentação adequada durante a primeira infância é essencial para garantir a saúde, o crescimento e o desenvolvimento em condições ideais, especialmente durante a fase crítica que vai do nascimento até os dois anos de idade (LANIGAN & SINGHAL, 2009; WHO, 2008; BRASIL, 2015a). A má nutrição decorrente de comportamentos alimentares inadequados nesta fase da vida pode causar danos imediatos que aumentam as taxas de morbimortalidade infantil e podem resultar em consequências como retardo de crescimento, atraso escolar, assim como a obesidade e seus riscos para o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas na vida adulta (UNICEF, 2015; UNICEF, 2020).

O leite materno (LM) é, indiscutivelmente, o alimento que reúne as características nutricionais ideais com balanceamento adequado de nutrientes, estando sempre disponível à temperatura ideal e sem contaminações, além de favorecer inúmeras vantagens imunológicas e psicológicas importantes na diminuição da morbidade e mortalidade infantil. Por este motivo, a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), o Ministério da Saúde do Brasil (MS), assim como outras entidades como a Sociedade Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (ESPGHAN), recomendam que pelo menos até os seis meses de idade a criança seja alimentada exclusivamente com o LM. Após essa fase, alimentos complementares à amamentação devem ser ofertados, pelo menos até o final do primeiro ano de vida, podendo se estender a até os dois anos de idade (WHO, 2003a; EC, 2006; EFSA, 2014; BRASIL, 2015b; FEWTRELL et al., 2017).

Entretanto, por diferentes razões, existem mulheres que não conseguem amamentar, seja por questões relacionadas à saúde da mãe, como por exemplo infecções por agentes de alta patogenicidade, pelo uso de medicamentos incompatíveis com a amamentação ou pela produção insuficiente ou ainda mesmo pelo simples fato da mãe não querer amamentar. Além disso, temos as questões relacionadas à saúde do lactente, como a intolerância à lactose ou crescimento abaixo do adequado. Para estes casos, as sociedades científicas nacionais e internacionais recomendam o uso de fórmulas infantis (FIs) como substituto ou complemento do LM. De acordo com a comunidade médica, as FIs são o único produto lácteo considerado nutricionalmente aceitável para crianças menores de um ano, pois são manipuladas para fornecer uma composição nutricional o mais próximo possível das características nutricionais

e funcionais do LM, garantindo assim um crescimento e desenvolvimento adequado, maturação do sistema imunológico e a programação do sistema metabólico (APP, 2012; SBP, 2018).

As FIs são elaboradas industrialmente e devem seguir as diretrizes e legislações vigentes que descrevem os requisitos ideais para a sua composição, qualidade e segurança. São comercializadas em sua forma líquida ou em pó, sendo que no Brasil só há a comercialização da forma em pó. São compostas por proteínas isoladas do leite de vaca ou de outros animais e/ou vegetais, podendo estar intactas ou hidrolisadas, sendo todos os demais nutrientes adicionados nas quantidades e proporções recomendadas para cada estágio do desenvolvimento (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b; CODEX, 2007).

Para melhor atender às necessidades metabólicas do lactente e evitar limitações ou excesso de nutrientes, a composição das formulações deve levar em consideração a faixa etária, bem como as situações especiais de saúde. Assim, uma variedade de FIs está atualmente disponível no mercado mundial. As FIs para lactentes são recomendadas para crianças desde os primeiros dias de vida até a introdução da alimentação complementar que se inicia a partir do sexto mês. As FIs de seguimento para lactentes são recomendadas para crianças de seis meses ao primeiro ano de vida. Além das fórmulas tradicionais mencionadas acima, existem também as FIs especiais destinadas a atender as necessidades nutricionais de lactentes que tenham alguma restrição alimentar decorrentes de alterações fisiológicas ou doenças temporárias ou permanentes, e para redução de risco de alergias em indivíduos predispostos (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b; BRASIL, 2014a).

As FIs contêm uma composição essencial de proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas, minerais, oligoelementos e outras substâncias, como colina, mio-inositol, L-carnitina e ingredientes opcionais, assim como aditivos alimentares (CODEX, 2007). As FIs mais comercializadas utilizam o leite de vaca (LV) como principal matéria-prima básica, uma vez que é de fácil obtenção e apresenta baixo custo em relação ao leite de outras espécies; no entanto, como o LV integral não é adequado para crianças menores de um ano de idade, é necessário que ele passe por transformações tecnológicas na sua composição de macro e micronutrientes para torná-lo mais seguro e adequar suas características nutricionais próximas às do LM (KOLETZKO, et al., 2012; LÖNNERDAL, 2014; LÖNNERDAL & HERNELL, 2014). Essas modificações consistem principalmente na redução do teor de proteínas e adição de frações proteicas de melhor qualidade, redução e substituição da gordura do leite por óleos vegetais, alterando a proporção dos ácidos graxos saturados e insaturados. Ocorre também a adição de lactose e suplementação com fruto-oligossacarídeos (FOS) e galacto-oligossacarídeos

(GOS), minerais e vitaminas. Dessa forma, a composição das FIs vem sendo constantemente aprimorada, não apenas para aumentar as semelhanças nutricionais com o leite humano (LH), mas também para incluir compostos bioativos específicos que estão envolvidos em múltiplos processos fisiológicos (ESPGHAN COMMITTEE ON NUTRITION et al., 2009; HERNELL, 2011; KOLETZKO et al., 2012; RÊGO et al., 2018). Entretanto, apesar do avanço no processo tecnológico, essas fórmulas ainda apresentam grandes diferenças na composição quando comparadas ao LM. A adição desses ingredientes criou novos desafios científicos não abordados pelas normas existentes. Sendo assim, é importante que a adição destes compostos seja previamente apoiada por uma avaliação abrangente de sua segurança e eficácia, uma vez que o "efeito funcional" nem sempre é equivalente ao efeito sobre a saúde (KOLETZKO et al., 2012; LÖNNERDAL, 2012).

Com relação ao conteúdo proteico, as proteínas são nutrientes essenciais e sua ingestão na quantidade adequada e de qualidade, ou seja, de elevado valor biológico, no qual dependerá de sua composição, digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, é fundamental para o crescimento e desenvolvimento nos dois primeiros anos de vida da criança (MICHAELSEN et al., 2014; ZHANG et al., 2013). Em relação às proteínas, o LM e o LV diferem entre si em quantidade e qualidade. Uma das principais diferenças está relacionada ao teor, que no LM fornece em média 1,3 g/mL, enquanto no LV é cerca de 3,3 g/mL, quase o triplo da quantidade. Esse excesso de proteínas pode aumentar a carga renal de solutos, que deverão ser filtrados por um rim ainda imaturo, e a longo prazo pode levar à obesidade e doença associadas. Uma outra diferença está no perfil de proteínas (qualidade). No LM observa-se uma maior proporção de proteínas do soro (60%), e menor de caseína (40%), sendo ele de fácil digestão (uma vez que as proteínas do soro apresentam melhor digestibilidade). Já no LV, essa proporção é inversa. Além disso, com relação às proteínas do soro, o LM apresenta predominância da α -lactoalbumina (α -La), uma proteína de elevado valor biológico, uma vez que contém um melhor aporte de aminoácidos essenciais, principalmente o triptofano e a cisteína, responsáveis pelo desenvolvimento neurológico, e a lactoferrina (Lf), que é uma proteína multifuncional, sendo considerada uma importante molécula de defesa do hospedeiro, no qual está envolvida em várias funções biológicas. Já no LV, predomina a β -lactoglobulina (β -La), que é uma proteína de baixo valor biológico e com alto poder alergênico, e não está presente no LM.

Seguindo os requisitos relativos à qualidade das FIs definidos pelos órgãos reguladores nacionais e internacionais, esses produtos devem ter segurança nutricional e devem ter uma

formulação adequada para apoiar o crescimento e desenvolvimento da criança. Os fabricantes de FIs são os responsáveis por testar suas fórmulas quanto ao teor de nutrientes no final de sua produção e prazo de validade (FDA, 2014). Um dos principais determinantes da avaliação nutricional dos alimentos é a sua qualidade proteica. A qualidade de uma fonte proteica pode ser determinada através de três características: o conteúdo de proteína, a concentração de aminoácidos essenciais e a sua digestibilidade (quantidade de proteína biodisponível durante a digestão), bem como através da biodisponibilidade de aminoácidos essenciais por meio do escore químico de aminoácidos e pelo escore de aminoácidos corrigido para digestibilidade da proteína (WHO, 2007; FAO, 2013). Além disso, determinar a concentração de proteínas bioativas também é uma forma de avaliar a qualidade de um alimento, uma vez que estas promovem uma variedade de funções biológicas, além da simples nutrição, como o crescimento e desenvolvimento da microflora intestinal, auxilia na absorção de minerais essenciais (cálcio, zinco, fósforo e ferro), desempenhar um papel importante na função imunológica, fornecendo defesa contra bactérias e vírus patogênicos, bem como desempenham um papel importante no neurodesenvolvimento infantil (TRABULSI et al., 2011; FLEDDERMANN et al., 2014; JOHNSTON et al., 2015; OROPEZA-CEJA et al., 2018).

Além disso, o leite e a maioria dos produtos lácteos, podem conter, além dos nutrientes, substâncias nocivas, como contaminantes químicos que geralmente estão presentes nestes alimentos devido à possível contaminação da matéria-prima e/ou durante as várias etapas dos processos de fabricação, ou até mesmo transferidos da embalagem do produto acabado (ANASTASIO et al., 2006). A presença destes contaminantes nos alimentos pode trazer sérios riscos associados à vida e à saúde se avaliarmos a exposição a essas substâncias em um determinado período e se levarmos em consideração a frequência de seu consumo (WHO, 2009). Crianças na fase inicial da vida são mais vulneráveis aos efeitos tóxicos e a exposição a esses metais, uma vez que se encontram em um período sensível de seu desenvolvimento. Sabendo-se que as FIs são elaboradas a partir do LV, não podemos ignorar o fato de que é possível que estes produtos também possam conter algumas destas substâncias (PEREIRA et al., 2020). Investigações anteriores que avaliaram FIs comercializadas em diferentes países quanto à contaminação por metais pesados revelaram que algumas das marcas avaliadas estavam contaminadas por estes metais tóxicos (CASTRO et al., 2010; DABEKA et al., 2011; MORISSET et al., 2013; SIPAHI et al., 2014; CARIGNAN et al., 2015; BARGELLINI et al., 2018). Os metais pesados estão naturalmente presentes no meio ambiente ou são resultados de atividades industriais e agrícolas, que podem poluir o solo, a água, as plantas e outros

compartimentos do ecossistema (AKHTAR et al., 2015). A principal via pela qual a matéria-prima para a produção de FIs à base de leite é contaminada com metais pesados é pela ingestão de alimentos e água contaminados por animais produtores de leite (CRUZ et al., 2019). Elementos como arsênio, cádmio, mercúrio, chumbo e alumínio não têm efeitos benéficos e são tóxicos, devido ao potencial de se acumularem em diferentes partes do corpo humano e causar efeitos adversos à saúde, mesmo em baixas concentrações (DURUIBE et al., 2007; PERELLÓ et al., 2014). A exposição excessiva a esses elementos químicos pode prejudicar irreversivelmente o desenvolvimento infantil (CHOI et al., 2017). De acordo com o Codex Alimentarius, estes contaminantes devem cumprir os níveis máximos estabelecidos para esses produtos (CODEX, 2016, 2017). As crianças apresentam alto risco de efeitos indesejáveis pela ingestão de substâncias nocivas por meio da alimentação, e por isso os fabricantes de FIs devem cumprir normas rigorosas estabelecidas para garantir a segurança desses produtos (KOLETZKO et al., 2012).

Tendo em vista que na maioria das vezes esta é a única fonte de alimentação oferecida ao lactente e que as necessidades proteicas da dieta durante a fase inicial da criança são as mais elevadas é essencial avaliar se as proteínas que estão presentes nas FIs são de qualidade, se o conteúdo total de proteínas está de acordo com as recomendações estabelecidas pela legislação nacional e internacional, bem como verificar a disponibilidade de proteínas com características bioativas, assim como analisar criteriosamente a conformação da rotulagem das FIs comercializadas. Paralelamente à avaliação da qualidade nutricional das FIs é de extrema importância garantir sua segurança através da verificação de uma possível contaminação destas fórmulas por metais tóxicos. Portanto, este é um estudo quantitativo e qualitativo que teve por objetivo avaliar a qualidade nutricional de diferentes marcas de fórmulas infantis para lactentes (0–6 meses) e de seguimento para lactentes (6–12 meses) comercializadas no Brasil. Para isto foi avaliado a qualidade proteica por meio do conteúdo total, perfil proteico, composição de aminoácidos essenciais e escore químico de aminoácido, assim como sua biodisponibilidade após digestão *in vitro*. Ademais foi avaliada a composição de minerais essenciais, bem como a presença de metais potencialmente tóxicos e avaliado seu possível risco à saúde infantil. Adicionalmente foi verificada a conformidade das rotulagens frente à legislação brasileira.

1.1 Referencial teórico

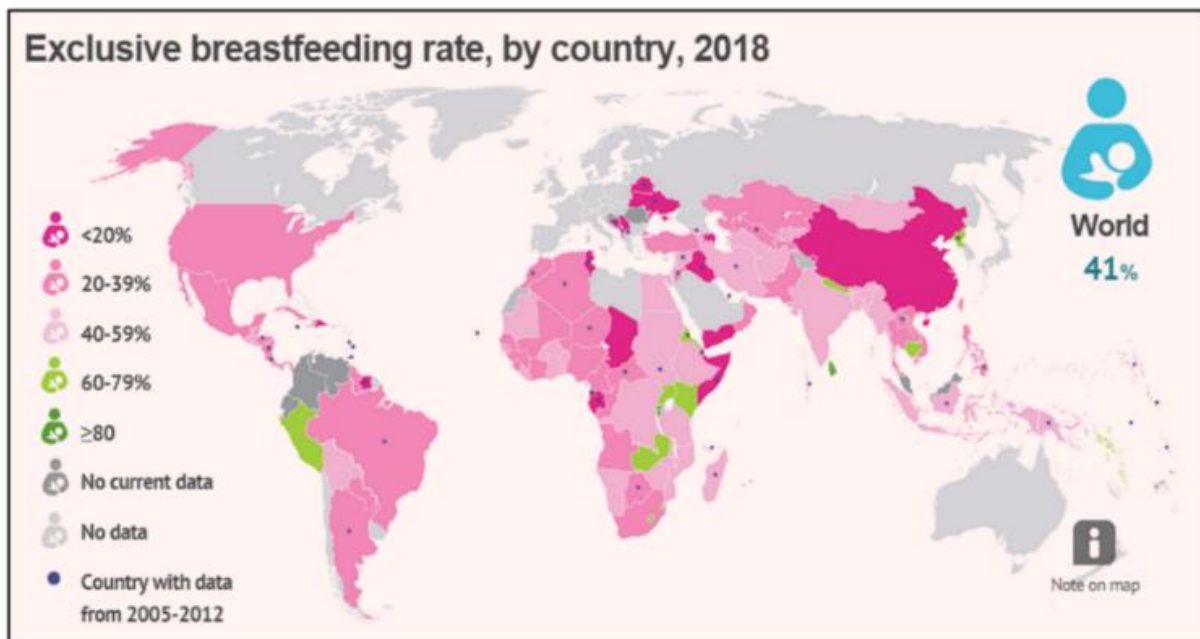
1.1.1 Leite materno

O LM fornece nutrientes de forma prontamente biodisponível, garantindo o crescimento e desenvolvimento ideal da criança, especialmente no primeiro ano de vida e por isto é reconhecido como o padrão-ouro para a nutrição infantil (ERICK, 2018). Além disso, não requer controle de qualidade da fabricação, transporte, armazenamento e mecanismos de alimentação quando comparado ao seu substituto (ROLLINS et al., 2016; VICTORA et al., 2016). Além dos seus nutrientes básicos, o LM contém uma gama de enzimas funcionais, fatores de crescimento, fatores de proteção gastrointestinal, células funcionais imunes, em como fontes de nitrogênio não proteico (GUO, 2014).

Os benefícios advindos da amamentação exclusiva à saúde da criança e suas consequências a curto e longo prazo, já são cientificamente comprovados. Além do suprimento das necessidades nutricionais, a amamentação pode conferir proteção contra diabetes (NUCI et al., 2015), facilidade na eliminação do mecônio (GABRIELLI et al., 2011), componentes imunológicos, prevenir alergias (BALDERBOS et al., 2012; VANDENPLAS et al., 2017), diminuir o risco de icterícia (MAISELS, 2006), proteção da flora intestinal evitando diarreias, proteção contra infecções que podem causar a exemplo pneumonias (VAN DEN BROEK et al., 2008), entre outras (ILSI BRASIL, 2018). Para as mães, a amamentação ajuda o útero a recuperar o tamanho normal, diminuindo o sangramento, e evitando a anemia materna; acelera a perda de peso; reduz o risco de câncer de mama, ovário e endometrial, e depressão pós-parto. Previne a osteoporose e protege contra doenças cardiovasculares, como o ataque cardíaco. Ademais, promove o vínculo entre mãe e filho (MARTINS, 2013; COMITÉ DE NUTRIÇÃO DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE PÉDIATRIE et al., 2013).

Embora tenha havido avanços e retrocessos na prática da amamentação ao longo dos anos, sabe-se que o LM é utilizado na amamentação das crianças desde o surgimento da raça humana, e que o processo de amamentação é prática biologicamente determinada, mas socialmente condicionada (VINAGRE et al., 2001). Globalmente, apenas 41% dos recém-nascidos são amamentados na primeira hora do nascimento e apenas 2 em cada 5 bebês com menos de 6 meses de idade são amamentados exclusivamente (Figura 1) (ILSI BRASIL, 2018). De acordo com dados divulgados pela UNICEF (2018), menos de 3/4 das crianças de 12 a 15 meses são amamentadas.

Figura 1 - Taxa de aleitamento materno exclusivo por país



Fonte: (UNICEF, 2018)

O LM é um biofluido extremamente complexo e dinâmico, cuja concentração varia não apenas entre mães, como na mesma mãe ao longo do dia e das mamadas, mas também ao longo da lactação, refletindo assim as necessidades fisiológicas de cada fase do desenvolvimento da criança (MICHAELSEN et al., 1990; RECHE, 2013; RAI et al., 2014). O colostro é o primeiro leite excretado, obtido em média até o sétimo dia após o parto, é rico em proteínas, vitaminas lipossolúveis (incluindo E, A e K) e minerais como sódio e zinco. No entanto, o colostro contém menores quantidades de lactose, gorduras e vitaminas hidrossolúveis. Além disso, o colostro é rico em fatores de defesa, como imunoglobulinas (Igs) e outros agentes antimicrobianos, substâncias imunomoduladoras e agentes anti-inflamatórios e possui bactérias probióticas que promovem a colonização do trato gastrointestinal infantil pelas bifidobactérias, reduzindo assim riscos de doenças intestinais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; NOVAK et al., 2001; CALIL, 2003).

A figura 2 ilustra as três fases da composição do LM. As modificações na composição do LM após o sétimo dia ocorrem de forma gradual e progressiva, sendo denominado leite de transição e vai até o 15º dia após o parto. O teor de proteínas e minerais vai gradativamente reduzindo, e o de gordura e carboidratos ligeiramente aumentando até atingir as características do leite maduro. Já o leite maduro, produzido em média a partir do 15º dia após o nascimento, possui uma composição variada, mas sempre atendendo às necessidades imunológicas,

fisiológicas e nutricionais da criança. Seus principais componentes são água, proteínas, carboidratos, lipídeos, minerais e vitaminas (GUERRERO, 1990; EUCLYDES, 2005). Em relação à composição do leite durante a lactação, o leite no início possui aspecto aguado e ralo, sendo rico em proteínas, lactose, vitaminas, minerais e água. No final da lactação, o leite secretado é amarelado, com maior teor de gordura, fornecendo energia e saciando a fome da criança, demonstrando que tanto no início quanto no final, o leite tem importância fisiológica para a criança (PRENTICE, 2016).

Figura 2 - Composição do leite materno ao longo da lactação



Fonte: (Adaptado de <https://www.help-sc.com.br/blog/dicas-help/leite-materno-o-carinho-que-vem-do-peito/>)

Foram identificados no LM mais de 200 componentes, sendo a água o componente presente em maior quantidade (87,0%). As proteínas insolúveis são as responsáveis pelo crescimento celular; as proteínas do soro (solúveis) conferem proteção contra agentes infecciosos; os carboidratos atuam como fonte de energia; já as vitaminas lipossolúveis e os lipídeos desempenham funções variadas e os minerais são indispensáveis na nutrição do

lactente. Além dos nutrientes essenciais (carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais), o LM contém uma infinidade de compostos bioativos que desempenham diferentes funções fisiológicas além da simples nutrição (BALLARD & MORROW, 2013; PARK & NAM, 2015).

Muitos componentes do LM exercem tarefas multifuncionais. A Lf, imunoglobulina A (IgA) secretória, lisozima (Lz), leucócitos, macrófagos, linfócitos, oligossacarídeos, fibronectina e mucinas atuam como componentes antimicrobianos. Além disso, a Lf, Imunoglobulina A secretora (IgAS), Lz, acetil hidrolase, citocinas anti-inflamatórias e antagonistas dos receptores das citocinas pró-inflamatórias podem atuar como componentes anti-inflamatórios. A Lf, α -tocoferol, β -caroteno, cisteína, ácido ascórbico, ácido úrico, catalase e glutathione peroxidase atuam como compostos antioxidantes. E existem os fatores de crescimento da epiderme, fatores de crescimento transformador, fatores de crescimento dos granulócitos e dos monócitos atuando como fatores protetores ou agentes ativos contra infecção e/ou inflamação (GUO, 2014).

Inúmeros estudos examinaram as influências das características individuais maternas na composição do leite. Fatores importantes conhecidos por influenciar a composição do LM como o aumento gradual no teor de gordura do leite ao longo da mamada, o período de lactação e a dieta materna têm efeitos bem definidos. No entanto, outras influências em potencial como o tipo de parto e o índice de massa corporal materno, têm poucas evidências científicas descritas na literatura. As dificuldades em avaliar com precisão a composição do LM exigem esforços para elucidar o verdadeiro valor desses efeitos.

1.1.2 Composição do leite materno vs fórmulas infantis elaboradas a partir de leite de vaca

1.1.2.1 Proteínas

As proteínas são substâncias que contêm nitrogênio e são formadas por aminoácidos que formam cadeias entre si por intermédio de ligações peptídicas. As proteínas se diferenciam principalmente pelo número de aminoácidos e pela sequência em que eles se dispõem nas cadeias polipeptídicas, conferindo a elas diferentes funções no organismo. Entre suas principais funções destacam-se sua atuação como o principal componente estrutural dos músculos e outros tecidos do corpo, além de estarem envolvidas na produção de hormônios, enzimas e

hemoglobinas. Diante da sua importância, é fundamental que sejam obtidas por meio de uma boa alimentação (WHITFORD, 2005; PHILLIPS & WILLIAMS, 2011).

As proteínas presentes no LM são cruciais para o crescimento e desenvolvimento entre o nascimento e o desmame. Seus requisitos na dieta durante esse período são os mais altos, pois precisam apoiar a manutenção e a formação dos tecidos do corpo. As proteínas não apenas fornecem uma fonte de aminoácidos, mas também são responsáveis por diversas outras funções, como: a melhora na biodisponibilidade de micronutrientes (vitaminas, minerais e oligoelementos), proteção contra agentes infecciosos, estimula o crescimento e a maturação da microbiota intestinal, além de aprimorar o aprendizado e a memória, conferindo assim, benefícios a curto e a longo prazo (LÖNNERDAL, 2016).

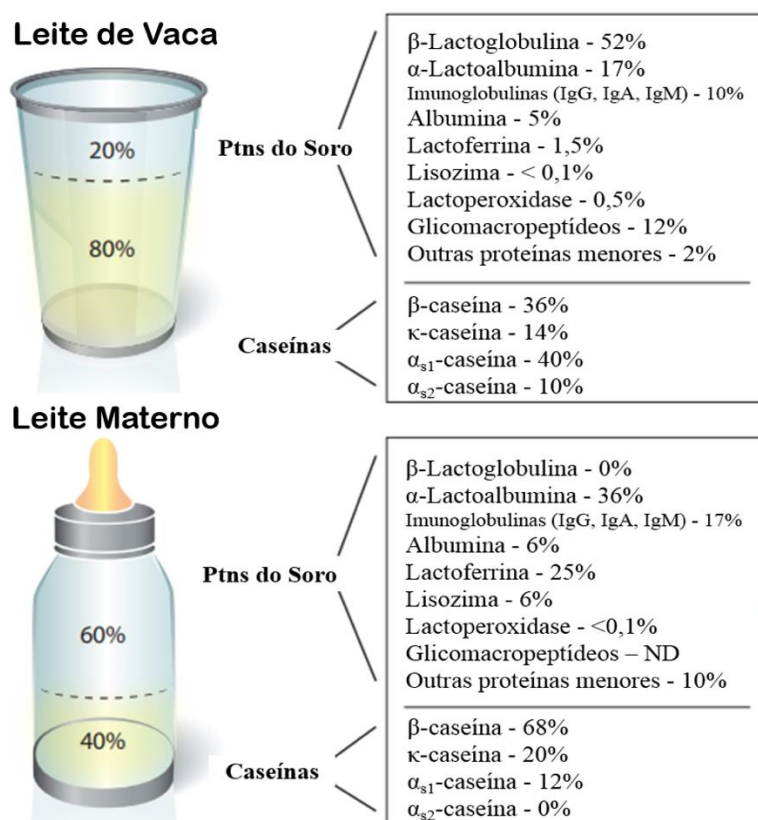
O LM contém uma grande variedade de proteínas responsáveis por diferentes funções no organismo infantil. Muitas dessas proteínas são digeridas e fornecem uma fonte balanceada de aminoácidos para bebês em rápido crescimento. As proteínas presentes no LM e no LV diferem entre si tanto em quantidade, quanto em qualidade. A quantidade e qualidade das proteínas presentes em uma dieta é um ponto chave do valor nutricional da alimentação infantil. O LM contém em torno de 0,8 a 1,3 g/100mL de proteína, o que varia com o estágio da lactação, enquanto o LV integral contém por volta de 3,3 g/100mL, ou seja, quase o triplo da quantidade de proteínas presente no LM (DUPONT, 2003; PRENTICE et al., 2016; RÊGO et al., 2018; DONOVAN et al., 2019). Esse excesso de proteínas pode aumentar a carga renal de solutos, que deverá ser filtrado por um rim ainda imaturo. Ademais, pode levar à obesidade infantil, gerando consequências a longo prazo, como doenças cardiometabólicas, além de ser um importante preditivo da obesidade na vida adulta (MARTIN et al., 2016).

O LM contém mais de 400 frações de proteínas que podem ser classificadas em 3 categorias: caseínas (CNs), proteínas do soro e proteínas presentes na membrana do glóbulo de gordura (MFGM). As proteínas presentes em quantidades significativas na fração do soro de leite são as Igs, α -La, Lf, osteopontina (OPN), Lz, soroalbumina (BSA) e lactoperoxidase (LPO) (HASCHKE et al., 2016; LÖNNERDAL et al., 2016; DONOVAN et al., 2019). Em geral, as concentrações dessas proteínas diminuem acentuadamente do colostro para o leite maduro, com exceção da Lz, que permanece relativamente estável (LÖNNERDAL et al., 2016). As CNs no LM consistem em várias subunidades (α -, β - e κ -CNs), com menor concentração de α -CN, enquanto o LV contém α_{s1} -, α_{s2} -, β -, γ - e κ -CNs. As concentrações de CNs e das proteínas do soro mudam rapidamente ao longo da lactação. Enquanto o colostro é rico em fatores de defesa, sendo representados por concentrações elevadas de Igs, principalmente a IgAs e a Lf, a

CN é praticamente indetectável no colostro. A síntese de CNs na glândula mamária e a sua concentração no leite aumentam, enquanto a concentração das proteínas do soro diminui. Desta forma, a proporção de proteínas do soro em relação às CNs varia de 90/10 no (início) para 60/40 (final) (LÖNNERDAL, 2003; LÖNNERDA et al., 2017).

As proteínas do LM são estruturalmente e qualitativamente diferentes das proteínas do LV (Figura 3). Além disso, a relação de proteínas do soro/caseína no LV é de 20/80. A proporção do soro/caseína na FI é semelhante ao leite humano maduro (60/40), no entanto, as FIs contém todas as caseínas encontradas no LV (HERNELL, 2011; ALMEIDA, 2013; LÖNNERDA et al., 2017). Dado que a quantidade de proteína total no LV é mais do que o dobro do LM, o LV claramente contém consideravelmente mais caseína do que o LM. A CN é uma proteína de digestão lenta, coagulando no estômago e resultando em uma liberação mais lenta de aminoácidos, diferente da proteína do soro de leite, que é uma proteína de digestão rápida e altamente biodisponível. Além disso, a caseína tem sido associada a uma série de doenças e alergias, incluindo diabetes tipo 1 (NUCCI et al., 2015).

Figura 3 - Percentual das frações proteicas presentes no leite de vaca e leite materno



Fonte: (LIVNEY et al., 2010; VINCENZETTI et al., 2017)

Comparando-se com as proteínas do soro do LV, o LM apresenta predominância da α -La, uma proteína de elevado valor biológico, e melhor aporte de aminoácidos essenciais, principalmente o triptofano e a cisteína, principais responsáveis pelo desenvolvimento neurológico (NUCCI et al., 2015). Além disso, essa proteína tem uma atuação importante no sistema enzimático da síntese de lactose (CAVAGNI et al., 1985). Já no LV, predomina a β -Lg, uma proteína de baixo valor biológico e com alto poder alergênico, que não está presente no LM (ALMEIDA, 2013). O LV tem concentrações menores de α -La, Lf e OPN em comparação com o LM (LIAO et al., 2017; DEMMELMAIR et al., 2017).

Grande parte dos estudos que investigaram a composição de proteínas no LM foram focados nas proteínas majoritárias. Entretanto, é importante que a identidade e a funcionalidade das proteínas minoritárias também sejam caracterizadas, pois essas proteínas desempenham funções significativas no crescimento, imunidade e desenvolvimento infantil. Historicamente, tem havido uma série de desafios técnicos associados à caracterização dessas proteínas minoritárias no LM. Estudos iniciais utilizando eletroforese em gel não foram capazes de detectar mais de 10 pontos proteicos distintos (LIAO et al., 2011). Essa dificuldade decorre do fato de que as proteínas majoritárias (α -La, β -CN, IgA, Lz e Lf) constituem mais de 90% do conteúdo total de proteínas no LM maduro, obscurecendo a detecção de proteínas de potencial interesse biológico menos abundantes e de menor peso molecular (RAI et al., 2014; LÖNNERDAL, 2016).

Para que as proteínas sejam usadas pelo corpo, elas precisam ser metabolizadas em sua forma mais simples, os aminoácidos. Logo, ao determinar as necessidades proteicas, primeiro é necessário considerar as necessidades de aminoácidos, pois embora os benefícios sejam vinculados a proteína, a exigência biológica é para os aminoácidos. Os aminoácidos são as unidades estruturais básicas da proteína e sua diversidade fornece variabilidade na função e estrutura das proteínas. Dos vinte aminoácidos existentes, nove (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) não são sintetizados pelo corpo, e, por isso, são considerados constituintes essenciais para manutenção da saúde e do crescimento, precisando ser obtidos na dieta.

O perfil de aminoácidos das proteínas do LM é bastante adequado às características metabólicas do lactente, pois fornece todos os aminoácidos essenciais compatíveis com as necessidades e limitações metabólicas do lactente, o que não acontece com o LV (NRC, 1989; GUO, 2014). As diferenças na composição da proteína do soro e da caseína entre o LV, o LM e as FIs resultam na entrega de diferentes quantidades de aminoácidos ao bebê durante a

alimentação. Os aminoácidos são necessários para a síntese de proteínas corporais e outros compostos importantes, e para que a síntese de proteínas prossiga em taxas ótimas, todos os aminoácidos essenciais devem estar presentes na dieta em proporções adequadas (NRC, 1989). Se mesmo um aminoácido essencial estiver presente em uma concentração abaixo do ideal, a taxa de crescimento e o desenvolvimento do neonato podem ser prejudicadas.

Os aminoácidos triptofano e cisteína são dignos de discussão específica. As concentrações de triptofano e cisteína no LV são aproximadamente metade das encontradas no LM, quando expressas como uma proporção da proteína total. Esses aminoácidos têm papéis importantes além da síntese de proteínas. O triptofano é um precursor da serotonina, um neurotransmissor que pode regular o ritmo sono-vigília, a resposta ao estresse e outros processos fisiológicos.

A ingestão recomendada de proteína é baseada em uma ingestão adequada (IA) que reflete a ingestão média de proteína observada em lactentes alimentados principalmente com LM. As recomendações de ingestão proteica vão variar conforme o teor de proteína, da quantidade de aminoácidos essenciais oferecidas e da digestibilidade desta proteína. Para avaliar se a quantidade de aminoácidos presentes em uma fonte alimentar é suficiente para atender as demandas metabólicas, leva-se em consideração um valor de referência. Com base nesses valores, utiliza-se um padrão de pontuação projetado para comparar a qualidade da proteína. Os requisitos de aminoácidos para o lactente baseiam-se na suposição de que o LM atenderá a todos os requisitos de aminoácidos da criança. Assim, os especialistas concluíram que a composição do LM deve ser usada como referência para a formulação de substitutos do LM e como um guia para a alimentação complementar de bebês até os 6 meses de idade (WHO, 2007). O Instituto de Medicina dos EUA publicou estimativas semelhantes às emitidas pela OMS/FAO/UNU (2007) com as necessidades de aminoácidos das crianças expressas por quilograma de peso corporal e diminuindo com a idade.

As necessidades de aminoácidos para lactentes (0 - 6 meses) são baseadas na ingestão média de LM de 0,78 litros/dia e o conteúdo médio de cada aminoácido essencial no LM (Tabela 1). O EAR para aminoácidos essenciais em lactentes mais velhos (7–12 meses) são calculados usando o método fatorial. O método assume que o requisito de manutenção para cada aminoácido é semelhante ao dos adultos e os requisitos diferem nas crianças apenas pelas necessidades de crescimento. A necessidade de crescimento é estimada a partir da taxa de deposição de proteína, composição de aminoácidos da proteína do corpo inteiro e a eficiência de utilização da proteína.

Tabela 1 - Estimativas das necessidades de aminoácidos essenciais para lactentes de 0 a 6 meses e lactentes de 7 a 12 meses, baseando-se nas concentrações observadas no leite materno (Requisitos expressos em mg/g de proteína)

Aminoácidos Essenciais	FAO/WHO ^(a) mg/g ptn	Institute of Medicine ^(a)				
		0 – 12 meses (mg/g ptn)	0 – 6 meses (mg/kg)		7 – 12 meses (mg/kg)	
			EAR	AI/RDA	EAR	AI/RDA
Triptofano	8,5	18	n.d.	28	9	13
Valina	43	56	n.d.	87	39	58
Treonina	31	47	n.d.	73	34	49
Isoleucina	32	57	n.d.	88	30	43
Leucina	66	101	n.d.	156	65	93
Fenilalanina + Metionina + Cisteína	52	87	n.d.	135	58	84
Lisina	28	38	n.d.	59	30	43
Histidina	57	69	n.d.	107	62	89
	20	23	n.d.	36	22	32

Fontes: (WHO, 2007; TRUMBO, 2001)

Nota: ^aPadrão baseado na composição de aminoácidos do leite humano. n.d.: não determinado. EAR (*Estimated average requirement*). AI (*adequate intake*), RDA (*recommended dietary allowances*).

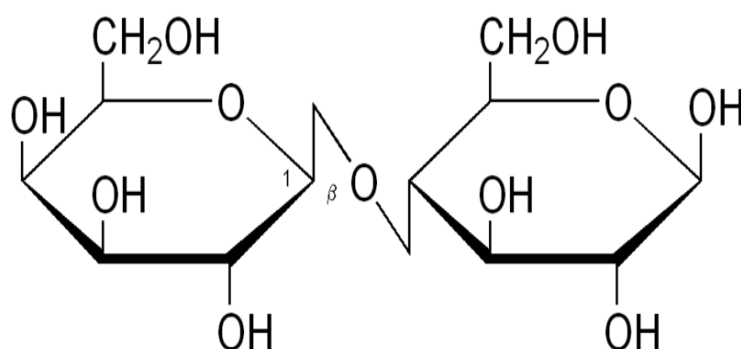
1.1.2.2 Carboidratos

A fração de carboidratos no LM é composta essencialmente por lactose (~87%) e oligossacarídeos (~12%), com pequenas concentrações de monossacarídeos livres (~1%). Outras fontes de carboidratos no LM são os glicoconjugados, que são carboidratos ligados a lipídeos (glicolipídeos), proteínas (glicoproteínas) ou peptídeos (glicopeptídeos) (PETERSON et al., 2013). Os carboidratos exercem diversas funções na saúde do lactente, sendo a lactose e os monossacarídeos livres, carboidratos fornecedores de energia, enquanto os oligossacarídeos têm a função de modular a microbiota intestinal e atuar como agentes protetores a infecções.

A lactose é o carboidrato mais abundante do LM, sua concentração varia entre 60 e 80 g/L e supre cerca de 40% das necessidades energéticas do lactente, fornecendo glicose como fonte de energia e galactose como base para síntese de galactopeptídeos, necessários ao desenvolvimento do sistema nervoso central (COPPA et al., 1993; GOROTE et al., 2016). Sua biossíntese é um processo dinâmico, ocorrendo nas glândulas mamárias por meio da ligação da galactose à glicose na posição β 1-4 (Figura 4), promovida pela enzima lactose sintase, enzima formada pela união da α -La com a galactosil-transferase (URASHIMA et al., 2012). Além disso, a lactose participa dos mecanismos de absorção de cálcio e ferro, bem como constitui

substrato para a flora intestinal do lactente, que produz grandes quantidades de ácido lático, reduzindo o pH do intestino, promovendo assim um ambiente favorável à proliferação de bactérias probióticas, como o *Bifidobacterium*, e desfavorável a bactérias potencialmente patogênicas (NOVAK et al., 2001).

Figura 4 - Estrutura química da lactose



Fonte: (DE REZENDE, s.d.)

Nota: A galactose (esq.) e a glicose (dir.) são ligadas por uma ligação β 1-4

Os oligossacarídeos do LM (*human milk oligosaccharides* - HMOs) são carboidratos compostos por 3 a 22 unidades de monossacarídeos e representam a terceira maior fração do LM, após a lactose e os lipídios. A maior parte ($\geq 95\%$) dos HMOs chega ao intestino intactos, onde exercem diversas funções, sobretudo na modulação da microbiota intestinal dos lactentes (BODE et al., 2015). Entretanto, seus efeitos vão muito além disso. Essas substâncias, denominadas originalmente de "fator bífido", atuam como prebióticos, promovendo o crescimento de um organismo benéfico chamado *Lactobacilos bífido*, que protegem o ambiente intestinal ao limitar o crescimento de diversos patógenos (BODE et al., 2012; QUEIROZ et al., 2013).

O efeito prebiótico ocorre na promoção de determinadas espécies dos gêneros *Bifidobacterium* e *Bacterioides*, que são os únicos grupos bacterianos capazes de hidrolisar e utilizar HMOs como fonte energética. No entanto, essa capacidade de utilizar HMOs não é comum a todas as espécies. Até o momento, a única espécie bacteriana identificada capaz de degradar a molécula completa de oligossacarídeos é a *Bifidobacterium longum subsp. infantis* (SELA et al., 2008). Outras espécies apenas são capazes de utilizar determinados HMOs ou porções específicas de HMOs mais complexos. Além de promoverem competitividade às bactérias probióticas, os HMOs atuam como moléculas antiadesivas, moduladores do epitélio

intestinal, e favorecem o desenvolvimento de bactérias probióticas, inibindo potenciais patógenos no trato gastrointestinal, promovendo desta forma uma microbiota intestinal equilibrada e saudável (BODE et al., 2015).

A síntese dos HMOs ocorre nas glândulas mamárias, e sua composição é influenciada pela genética materna, assim como sofre variação ao longo da lactação, diminuindo significativamente após os primeiros 3 meses pós-parto (BODE et al., 2012; BALLARD et al., 2013). Desta forma, a concentração de HMOs no colostro é de aproximadamente 30 a 23 g/L, diminuindo no leite maduro para 5 a 15 g/L (THURL et al., 2010; SMILOWITZ et al., 2014). Cada oligossacarídeo possui uma unidade de lactose em sua extremidade redutora; esta unidade atua como um precursor essencial para sua biossíntese. Os HMOs são sintetizados a partir de cinco monossacarídeos básicos: galactose, glicose, N-acetilglicosamina, fucose e um derivado do ácido siálico, o ácido N-acetilneuramínico (SMILOWITZ et al., 2014; KUNZ et al., 2017).

As frações dos HMOs são extremamente complexas, com mais de 200 moléculas já identificadas, embora acredita-se que o LM tenha mais de mil oligossacarídeos distintos (GARWOLIŃSKA et al., 2018). No decorrer da última década, diversos estudos foram realizados com o objetivo de determinar a complexidade dos oligossacarídeos do leite de muitas espécies. Esses estudos começaram a delinear as diversas funções dos HMOs. Tais ensaios demonstraram que o LM contém HMOs de concentração, diversidade estrutural e grau de fucosilação (força de ligação entre os polissacarídeos) maiores que os do leite de outras espécies, especialmente o LV, do qual derivam as fórmulas infantis (SMILOWITZ et al., 2014).

É importante destacar que os GOS, FOS e polidextrose (PDX) não são HMOs e não ocorrem naturalmente no LM, pois não são produzidos pelas glândulas mamárias. De fato, estes oligossacarídeos de origem sintética ou vegetal são estruturalmente muito diferentes dos HMOs, sobretudo na composição de monossacarídeos. GOS, FOS e PDX são polímeros de galactose, frutose e glicose, respectivamente, e não contêm N-acetilglicosamina, fucose e ácido siálico, como os HMOs (BODE et al., 2012).

1.1.2.3 Lipídeos

Os lipídios no LM podem ser divididos em quatro tipos: triacilglicerídeos ou triacilglicerol, ácidos graxos, esteróis e fosfolipídios. O triacilglicerol é o principal componente lipídico do leite, representando cerca de 98% do teor de gordura. Os outros três tipos de lipídios estão presentes em quantidades menores (JENSEN, 1998; CHANG, KE & CHEN, 2009; GUO,

2014). Embora os lipídios sejam os componentes mais variáveis do LM e sejam afetados pelo estágio da lactação, a composição lipídica no leite permanece constante. Os lipídios fornecem uma fonte concentrada de energia durante os primeiros meses de vida e suportam funções metabólicas e fisiológicas essenciais. Dentre estas, eles exercem funções como, auxiliar no transporte e absorção de compostos lipofílicos (incluindo vitaminas lipossolúveis, como as vitaminas A, D, E e K), formar a estrutura das membranas celulares e além de precursor de várias moléculas bioativas (BRENNA et al., 2007; BALLARD & MORROW, 2013; DELPLANQUE et al., 2015; KEIKHA et al., 2017).

As concentrações de lipídios no LM passam de aproximadamente 2 g/mL no colostro para 4 a 4,5 g/mL 15 dias após o parto, permanecendo estáveis, embora seu teor médio pode variar consideravelmente entre indivíduos e até mesmo durante a mesma mamada. Em algumas mulheres, a concentração de lipídios no leite final é 4 a 5 vezes maior do que no leite inicial. Esta alta concentração de gordura no leite final atua como um regulador de apetite (SILVA et al., 2005; GROTE et al., 2015).

Os ácidos graxos (AG) são componentes estruturais das membranas celulares e cumprem as funções energéticas e de reservas metabólicas, além de formarem hormônios e sais biliares. Dentro da diversidade dos AG, alguns são sintetizados pelo organismo e outros precisam ser adquiridos através da dieta, como o ácido alfa-linolênico (ALA) e o ácido linoléico (LA). Estes são precursores dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs): Ácido araquidônico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA), e ácido docosahexaenoico (DHA). Os PUFAs, ARA e DHA são componentes essenciais não só para o desenvolvimento neurológico quanto para a função visual da criança (SILVA et al., 2007; CHANG, KE & CHEN, 2009; KUS-YAMASHITA, 2017).

Em termos de composição de AG, o LM e o LV são bem diferentes (Tabela 2). O LV apresenta concentração maior de ácidos graxos de cadeia curta e média e quase nenhum PUFAs (GUO, 2014). Em relação ao colesterol, o LM contém de 90 a 150 mg/L, em contraste com o LV, que contém aproximadamente 40 mg/L (KAMELSKA et al., 2013). Ademais, os lipídeos do LM são melhores digeridos e absorvidos pela criança, pois sua digestão ocorre em parte, devido à alta concentração de lipase estimulada pelo sal biliar (BSSL), uma proteína bioativa presente no LM, que hidrolisa os ácidos graxos da posição sn-2 nos triglicerídeos (LÖNNERDAL, 2017).

Tabela 2 – Composição de ácidos graxos no leite humano e no leite de vaca

Ácidos Graxos (% total)	LM	LV
Ácido graxos saturados	48,2	65,6
Ác. butírico	-	-
Ác. capróico	-	1,9
Ác. caprílico	-	1,3
Ác. caprícho	1,4	2,4
Ác. láurico	6,2	2,8
Ác. mirístico	7,8	10,7
Ác. palmítico	22,1	27,8
Ác. esteárico	6,7	12,6
Monoinsaturado	39,8	30,3
Ác. palmitoleico	3,1	2,5
Ác. oleico	35,5	26,5
Ác. gadoléico	0,96	traço
Ác. cetoléico	traço	traço
Poliinsaturados	11,92	4,5
Ác. linoleico	8,9	2,9
Ác. linolênico	1,2	1,6
Ác. parinarico	-	traço
Ác. araquidônico (ARA)	0,72	traço
Ác. docosahexaenoico (DHA)	1,1	traço
Ác. eicosapentaenoico (EPA)	traço	traço

Fonte: (GUO, 2014)

Embora o conteúdo energético do LM possa fornecer algumas orientações para melhorar a composição das FIs, é difícil prever exatamente, pois essa concentração varia de acordo com a alimentação da mãe (STAM et al., 2013). Além disso, as principais diferenças entre o LM e as FIs dizem respeito à qualidade do suprimento lipídico, que varia de acordo com as fontes lipídicas utilizadas. Atualmente a fonte de lipídios que vem sendo mais utilizado nas FIs é derivada de uma mistura de óleos vegetais, óleos de peixe, óleos de algas, lipídios fracionados e/ou fosfolipídios dos ovos. Entretanto, o uso de gorduras provenientes do LV em FIs ainda é popular em algumas partes do mundo e recentemente tem sido alvo de atenção por causar alguns efeitos metabólicos favoráveis (DELPLANQUE et al., 2015; MEHROTRA et al., 2018).

1.1.2.4 Vitaminas

As vitaminas são micronutrientes essenciais para o crescimento infantil e o desenvolvimento cognitivo. O organismo não é capaz de produzir as vitaminas em quantidade suficiente, e portanto, precisam ser ingeridas em pequenas quantidades na dieta (GUO, 2014). O LM contém quantidades adequadas da maioria das vitaminas hidrossolúveis (vitaminas do complexo B, vitamina C e K) e lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K). Grande parte das vitaminas hidrossolúveis tem concentrações baixas no colostro, e aumentam no decorrer da lactação, ao contrário das vitaminas lipossolúveis, que são mais elevadas no colostro, com queda progressiva no decorrer da lactação (ILSI BRASIL, 2018). As vitaminas hidrossolúveis são facilmente metabolizadas e conseqüentemente mais rapidamente excretadas e por isso necessitam de maior reposição, enquanto as lipossolúveis podem ser mais facilmente estocadas no organismo. Devido esta diferença as vitaminas hidrossolúveis desempenham geralmente papel de coenzimas, ajudando o metabolismo celular de diferentes maneiras; já as vitaminas lipossolúveis geralmente têm papel mais na estrutura celular (MCCORMICK, 1999).

O que prediz o perfil e a concentração dessas vitaminas no LM é a dieta materna e suas reservas corporais. Vitaminas como o retinol (vitamina A), tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), piridoxina (vitamina B6), cobalamina (vitamina B12), colecalciferol (vitamina D) e iodo precisam ser consumidos pela mãe para estarem presente no LM. Esses nutrientes são transferidos para o leite através do sangue periférico da mãe para o epitélio mamário. No entanto, independentemente da dieta materna, a vitamina K é extremamente baixa no LM, assim como a vitamina D que também está em baixa concentração, particularmente devido à baixa exposição materna ao sol, uma circunstância hoje comum em populações em todo o mundo. Na tabela 3 estão apresentadas as concentrações de vitaminas do LM e do LV. Comparado ao LV, o LM contém uma concentração maior de vitamina A, tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), niacina (vitamina B3) e inositol, e, em contrapartida, possui uma concentração baixa de vitaminas B1, B2, B6, B12, K, ácido fólico (vitamina B9), biotina (vitamina B7) e ácido pantotênico (vitamina B5) (GREER, 2001; DAWODU et al., 2014; VALENTINE & WAGNER, 2013; GUO, 2014).

Tabela 3 - Teor de vitaminas no leite humano e no leite de vaca, e os valores recomendados para consumo

Vitaminas	Unid.	LM	LV	0 - 6 meses			6 - 12 meses		
				UL	EAR	AI	UL	EAR	AI
Vitamina A	mg	0,53	0,37	0,6	n.d.	0,4	0,6	n.d.	0,5
Vitamina D	µg	1,0	0,8	0,025	n.d.	0,005	0,025	n.d.	0,005
Vitamina E	mg	5,4	1,1	n.d.	n.d.	4	n.d.	n.d.	5
Vitamina K	µg	15	30	n.d.	n.d.	2,0	n.d.	n.d.	2,5
Vitamina B1 (Tiamina)	mg	0,15	0,42	n.d.	n.d.	0,2	n.d.	n.d.	0,3
Vitamina B2 (Riboflavina)	mg	0,37	1,72	n.d.	n.d.	0,3	n.d.	n.d.	0,4
Vitamina B6	mg	0,1	0,48	n.d.	n.d.	0,1	n.d.	n.d.	0,3
Vitamina B12	µg	0,3	4,5	n.d.	n.d.	0,4	n.d.	n.d.	0,5
Vitamina B3 (Niacina)	mg	1,7	0,92	n.d.	n.d.	2	n.d.	n.d.	4
Vitamina B9 (Ácido fólico)	mg	0,043	0,053	n.d.	n.d.	0,65	n.d.	n.d.	0,08
Vitamina C	mg	47	18	n.d.	n.d.	40	n.d.	n.d.	50
Vitamina B7 (Biotina)	µg	7	36	n.d.	n.d.	5	n.d.	n.d.	6
Vitamina B5	mg	2,1	3,6	n.d.	n.d.	1,7	n.d.	n.d.	1,8
Inositol	mg	300	160	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Colina	mg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	125	n.d.	n.d.	150

Fontes: (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997; INSTITUTE OF MEDICINE, 2000; TRUMBO, 2001; INSTITUTE OF MEDICINE, 2006; GUO, 2014).

Nota: n.d.: não determinado. LM (Leite materno), LV (Leite de vaca), UL (*Tolerable upper intake level*), EAR (*Estimated average requirement*), AI (*adequate intake*).

As vitaminas A e E são as vitaminas lipossolúveis mais comuns, no entanto as concentrações vão variar no leite dependendo da dieta materna e de suas reservas corporais. A vitamina A é um nutriente essencial e sua deficiência tem sido associada a uma série de distúrbios clínicos infantis (BRASIL, 2013a). Em geral, o LM fornece a quantidade adequada dessa vitamina nos seis primeiros meses de vida quando é oferecido de forma exclusiva (BALLARD & MORROW, 2014). O colostro é particularmente rico em vitamina A, e sua concentração diminui à medida que a lactação progride. No entanto, como o volume de ingestão de leite aumenta, a criança acaba recebendo a quantidades adequadas. A vitamina A atua no adequado funcionamento do sistema visual, na diferenciação celular, na integridade do tecido epitelial, na proteção contra o estresse oxidativo, na reprodução e no sistema imunológico,

sendo considerado o micronutriente melhor associado à prevenção de doenças infecciosas. Além disso, demonstra significativa relevância durante os períodos de proliferação e de rápida diferenciação celular tais como o período neonatal e a infância (PACIFICI, 2016). A OMS recomenda uma ingestão diária de vitamina A de 0,4 mg entre 0 a 6 meses e 0,5 mg entre 6 a 12 meses (BRASIL, 2013a).

O teor de vitamina E do LM depende de muitos fatores, incluindo variação individual e o estágio da lactação. O consumo alimentar materno também pode afetar o seu conteúdo, pois uma dieta materna com excesso de PUFA's sem o aumento concomitante na ingestão de vitamina E pode diminuir a sua concentração (OMS, 1994). Uma deficiência de vitamina E em neonatos pode resultar em anemia hemolítica, sendo mais frequente em prematuros do que nos nascidos a termo. Os níveis reduzidos de vitamina E em prematuros também podem estar relacionados às concentrações de PUFA's, ferro e selênio (SILVA et al., 2017). Portanto, os níveis de vitamina E podem ser mais baixos em bebês alimentados com FIs suplementada com PUFA's e ferro. Logo, bebês prematuros que não são amamentados devem receber fórmula enriquecida com vitamina E, bem como LC-PUFA (GUO, 2014).

A concentração de vitamina D no LM é tipicamente baixa ou indetectável (0,001 mg/mL), sendo insuficiente para as necessidades do bebê (OMS, 1994). Dados indicam que a suplementação de vitamina D para mães que amamentam (6.400 UI/dia) tem como propósito, aumentar o status nutricional de vitamina D da mãe e melhorar a nutrição da vitamina D do lactente que estão em aleitamento (GREER, 2001; MORROW & DAWODU, 2019). As manifestações clínicas da deficiência de vitamina D são relacionadas ao metabolismo do cálcio e podem demorar meses para aparecer na dependência da velocidade de crescimento da criança, do grau de deficiência desta vitamina e do conteúdo de cálcio na dieta. Hipocalcemia, hipofosfatemia, tetania, osteomalacia e raquitismo são os achados mais comuns (SBP,2014). Sabe-se que a melhor via de ingestão de vitamina D é através da pele, sendo o sol a principal fonte, e não através da dieta, pois as quantidades encontradas nos alimentos são baixas e não suficientes para a manutenção dos níveis ideais (HOLLIS & WAGNER, 2004). A pele, na presença de luz solar é adequada tanto para fabricar potencialmente grandes quantidades de vitamina D quanto para impedir a absorção de quantidades maiores do que a capacidade de uso e armazenagem do organismo (CASTRO, 2011). De acordo com dados publicados por Hollis & Wagner (2004), a dose diária de 0,01 mg de vitamina D demonstrou ser eficaz em elevar a concentração de vitamina D para a faixa normal aceita para bebês.

A maioria das vitaminas é obtida através da alimentação, no entanto, a vitaminas K, a biotina e o ácido fólico dependem parcialmente das bactérias comensais que vivem na microbiota do intestino para a sua síntese (TAN & O'TOOLE, 2015). A concentração de vitamina K no LM é baixa (0,015 mg/mL), independentemente da dieta materna, sendo recomendada a suplementação ao nascimento, por via intramuscular, a fim de prevenir a doença hemorrágica do recém-nascido (VAZ et al., 2017). A concentração de vitamina K é maior no colostro e no leite de transição, comparado ao leite maduro. No entanto, levando-se em consideração que após duas semanas a flora intestinal já se encontra formada nas crianças amamentadas, a concentração de vitamina K se mantém dentro do desejável (OMS, 1994). Quando o colostro não é ofertado para os bebês, o risco de doença hemorrágica é maior do que para os alimentados artificialmente, pois as FIs são suplementadas com vitamina K, e o LM contém pequenas quantidades dessa vitamina (BALLARD & MORROW, 2014).

As vitaminas do complexo B são vitaminas hidrossolúveis e estão diretamente ligadas ao bom funcionamento do metabolismo celular. Elas desempenham papéis principalmente como coenzimas, permitindo que a célula sintetize substratos importantes para sua manutenção, como AGs, aminoácidos, lipídios, fosfolipídios e até mesmo hormônios e neurotransmissores (GUO, 2014). Variações nas concentrações das vitaminas hidrossolúveis também são altamente dependentes da dieta materna. A vitamina B2, ao contrário das demais vitaminas do complexo B, possui nível lácteo elevado no início da lactação e vai decaindo ao longo da lactação (GARCIA et al., 2009). A concentração de vitamina B12 é muito baixa no LM, mas sua biodisponibilidade é aumentada pela presença de fator de transferência específico. No entanto, recomenda-se atenção aos sinais clínicos de deficiência de vitamina B12 nos lactentes em aleitamento materno exclusivo cujas mães são vegetarianas estritas, pois o conteúdo lácteo dessa vitamina é abaixo do ideal em tais nutrizes. A deficiência resulta, muitas vezes, em lesão neurológica grave e permanente, além de anemia megaloblástica (CRAIG, 2009). Assim, é importante a indicação de suplemento dessa vitamina (ILSI BRASIL, 2018). O consumo de altas doses de certas vitaminas foi associado a efeitos adversos, como no caso do ácido fólico, cujo excesso pode mascarar ou exacerbar sintomas de deficiência de vitamina B12 (GARCIA et al., 2009).

A concentração da vitamina B9 no LM aumenta no decorrer da lactação, variando de 15 a 20 µg/mL no início da lactação a 40 a 70 µg/mL no leite maduro (GUO, 2014). A deficiência de ácido fólico na infância pode causar anemia megaloblástica, leucopenia, trombocitopenia, retardo do crescimento, alteração da maturação do sistema nervoso central e atrofia das

vilosidades intestinais (CAMPOS-GIMÉNEZ et al., 2017). No entanto, esta deficiência pode ser rapidamente corrigida com suplementação diária. A quantidade no LM varia situando-se, em geral, em torno de 45 µg/dia. A maioria das FIs contém pelo menos 40 µg/dl (cerca de 60 µg/100kcal). Como é sensível ao calor, a possibilidade de deficiência de B9 em bebês alimentados com fórmulas que passam por tratamento térmico não deve ser desconsiderada (OMS, 1994).

Uma mistura de vitaminas normalmente é adicionada às FIs. Muitos estudos têm mostrado que bebês alimentados com FIs têm níveis plasmáticos de vitaminas mais alto do que bebês alimentados com LM (MARTIN et al., 2016). Entre os possíveis fatores de risco para o desequilíbrio nutricional, como deficiências ou excessos, o excesso de exposição às vitaminas pode ser o risco mais comum, pois pode causar neurotoxicidade e provocar desequilíbrio no metabolismo dos neurotransmissores (ZHOU et al., 2013).

1.1.2.5 Minerais e oligoelementos

Os minerais podem ser divididos em macrominerais e microminerais (oligoelementos ou minerais traço), o que faz relação à sua proporção no organismo e aos requerimentos nutricionais. Os minerais e oligoelementos respondem por cerca de 4% da massa corporal total, sendo de extrema importância para a alimentação infantil, pois cada um deles desempenha diferentes funções essenciais e específicas no organismo. São importantes para o crescimento, reparação e desenvolvimento (VASCONCELOS et al., 2011). Quando ocorre a deficiência desses minerais, são estabelecidas condições para o aparecimento de algumas doenças que acometem de forma mais prejudicial crianças, dentre elas, a anemia ferropriva, a desnutrição, dentre outras, comprometendo o desenvolvimento e crescimento infantil (BRASIL, 2007; FERGUSON et al., 2015).

No LM os principais macrominerais encontrados são: sódio (Na), potássio (K), cloreto (Cl⁻), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e fósforo (P). O principal determinante da concentração desses macrominerais no LM é a duração da lactação. À medida que a lactação prossegue, as concentrações de Na, Cl⁻ e K diminuem enquanto os níveis de Ca, Mg e P livres aumentam. O conteúdo mineral também pode ser influenciado pelo estado nutricional da mãe e outros fatores, como os efeitos ambientais (GUO, 2014).

Na, K e Cl⁻ são geralmente encontrados em quantidades suficientes em uma dieta materna normal, não sendo necessária uma alimentação especial. Os níveis só diminuem em

condições muito extremas, como por exemplo: a deficiência de Na e Cl⁻ que pode ocorrer como resultado de diarreia crônica, transpiração intensa ou doença renal. A falta de K pode ser causada por grandes perdas alimentares ou renais. No colostro, a concentração se mantém em torno de 480, 740 e 850 mg/mL para Na, K e Cl⁻, respectivamente, enquanto no leite maduro em torno de 160, 530 e 400 mg/mL, respectivamente (KEIKHA et al., 2017; HAMPEL et al., 2018; BUTTS et al., 2018).

O Ca e o P são importantes para a mineralização óssea fetal e pós-natal. O período de maior desenvolvimento esquelético e de mineralização óssea ocorre no terceiro trimestre de gestação, quando o feto incorpora quantidades elevadas de Ca e P, e as necessidades para estes minerais se mantêm mesmo após o nascimento. O teor de Ca no início da lactação, tende a aumentar de 250 mg/mL para 320 mg/mL no 5º dia, permanecendo constante até o 30º dia de lactação e diminuindo ao longo dos nove meses de lactação. Enquanto o P aumenta de 100 mg/mL para 170 mg/mL até 8º dia, e diminuem para 130 mg/mL até 30º dia lactação. Embora essas concentrações sejam adequadas para bebês nascidos a termo, não é suficiente para um bebê prematuro ou nascidos com baixo peso, uma vez que estes requerem uma concentração de Ca e P mais elevada (TRINDADE, 2005; KEIKHA et al., 2017; HAMPEL et al., 2018; DONAVAN, 2019).

A concentração de Mg no LM maduro é de cerca de 30 a 35 mg/mL. Estudos mostram que a concentração é cerca de 30% maior no colostro do que no leite maduro. O Mg é crucial para vários processos fisiológicos. Isso inclui transmissão neuromuscular, contração muscular, metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, crescimento ósseo e atividade enzimática. A concentração de Mg não varia de acordo com a ingestão da mãe. Níveis mais baixos geralmente ocorrem apenas no caso de desnutrição grave ou doença (LI et al, 2013; KEIKHA et al., 2017; DONAVAN, 2019).

Os oligoelementos ou microminerais são os demais elementos que estão disponíveis em menores concentrações, e compõe menos de 0,01% da massa corporal. Os oligoelementos no LM incluem ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn), iodo (I), fluoreto (F), selênio (Se), alumínio (Al), cromo (Cr), molibdênio (Mo) e cobalto (Co).

O Fe e o Zn são críticos para o crescimento normal, hematopoiese e desenvolvimento neurológico durante a infância, sendo os micronutrientes que mais limitam o crescimento infantil e o desenvolvimento cognitivo. O teor de Fe do LM diminui durante o curso da lactação, passando de cerca de 1 mg/mL no colostro para 0,3 a 0,6 mg/mL no leite maduro. Entre 6 e 12 meses de idade, existe um aumento do requerimento que não pode ser suprido diretamente pelo

Fe disponível no LM, logo, outras fontes dietéticas de Fe obtidas através de alimentos complementares são necessárias (EARL & WOTEKI, 1993; AUMEISTERE et al., 2018). O LM é considerado um protetor contra anemia por deficiência de Fe (BRASIL, 2007). O Fe é essencial para o transporte, armazenamento e utilização de oxigênio, pois faz parte do heme da hemoglobina, mioglobina, citocromos e outras proteínas (GUO, 2014). O Fe presente no LM resulta de uma série de interações complexas entre os componentes do LM e organismo do bebê. Estas interações, como por exemplo, a maior acidez do trato gastrointestinal, a presença de Zn, Co e Lf são importantes para aumentar a absorção de Fe.

No LV, a concentração de ferro varia entre 0,2 a 0,3 mg/L (LÖNNERDAL et al., 1981). Embora o conteúdo de Fe seja menor no LM, ele é significativamente mais biodisponível (45 a 100%) quando comparado com a FI (10%) (FOMON et al., 1993; LÖNNERDAL et al., 1981). A baixa biodisponibilidade do Fe no LV se deve principalmente ao fato de que nele há maior concentração de CN, principal proteína de ligação do ferro no LV (HEGENAUER et al., 1979). Desta forma, para compensar a baixa biodisponibilidade, grandes quantidades de Fe devem ser adicionadas às FIs, no entanto o excesso pode causar problemas ao saturar a Lf, diminuindo seu efeito bacteriostático e permitindo crescimento de patógenos, que podem causar dano intestinal e sangramento microscópico suficiente para produzir anemia ferropriva, e concomitantemente reduzir a absorção de Zn ou Co. Apesar da ausência de vários nutrientes (folatos, proteínas, vitamina B12, Zn e Co) contribuir para a ocorrência de anemias, a carência de Fe é indiscutivelmente o maior causador de anemia (BRASIL, 2013b).

O Zn é um mineral importante no processo de digestão e desenvolvimento neurológico. São essenciais na estrutura de enzimas e funcionamento, crescimento e imunidade celulares. Sua deficiência pode resultar em nanismo, desenvolvimento sexual prejudicado e anemia (KAMBE et al., 2015). As concentrações de Zn do LM são bastante altas nas primeiras semanas pós-parto, ficando em média em 3 mg/mL em 2 semanas, mas declina rapidamente durante as primeiras semanas da lactação para 1 mg/mL (KREBS et al., 1995). A ingestão de Zn na dieta não tem correlação com o teor de Zn no LM, e a suplementação de uma dieta adequada em Zn não afeta significativamente sua concentração no LM (GUO, 2014).

Comparando-se o conteúdo de minerais do LV com o LM (Tabela 4), observa-se que as concentrações da maioria dos minerais são menores no LM frente ao LV; porém a concentração no LM é melhor adaptada às necessidades nutricionais e capacidades metabólicas do bebê. O Ca, por exemplo, é absorvido mais eficientemente devido à alta relação Ca:P. No LV, a maior proporção de P determina sua absorção preferencial causando hipocalcemia neonatal, mais

comum entre bebês que recebem FIs. A disponibilidade de Ca do LV é ainda menor pela formação de sabões insolúveis no intestino, que podem causar obstrução intestinal. Uma forma de adequar as necessidades nutricionais de lactentes que precisam consumir as FIs, é corrigir os minerais, para que estejam nas concentrações ideais no produto pronto para o consumo. Um exemplo disto, é a modificação da proporção Ca:P, afim de melhorar a absorção de Ca, embora a variabilidade ainda seja muito grande (GUO, 2014).

As necessidades nutricionais representam valores fisiológicos individuais necessários para satisfazer as funções fisiológicas normais e prevenir sintomas de deficiências. Na tabela 4, estão descritos os valores de referência para ingestão dos macro e microminerais. O requisito médio estimado (*Estimated average requirement*, EAR) se refere à média das necessidades para os macro e micronutrientes em lactentes de 0 a 6 meses e lactentes de 7 a 12 meses; enquanto a ingestão adequada, (*Adequate intake*, AI), se refere ao valor recomendado para o consumo, baseado em dados experimentais. Vale ressaltar que alguns minerais, como por exemplo, Fe, Zn e Se, apesar de serem metais nutricionalmente essenciais em níveis baixos, podem ser nocivos quando estão em níveis mais elevados em uma dieta. Para avaliar o limite máximo ideal, deve-se levar em consideração o limite superior tolerável de ingestão (*Tolerable upper intake level*, UL), que é o limite mais alto de ingestão diária de nutrientes que aparentemente não apresenta risco de efeitos adversos à saúde (PADOVANI et al., 2006).

Tabela 4 - Teor de macro e microminerais no leite materno e no leite de vaca, e os valores recomendados para consumo

Minerais	Unid.	LM	LV	0 - 6 meses (mg/dia)			7 - 12 meses (mg/dia)			
				UL	EAR	AI	UL	EAR	AI	
Macrominerais										
Sódio	mg	15	58	-	-	-	-	-	-	-
Potássio	mg	55	152	-	n.d.	0,27	-	n.d.	11	
Cloro	mg	60	100	-	-	180	-	-	570	
Cálcio	mg	33	122	n.d.	n.d.	210	n.d.	n.d.	270	
Magnésio	mg	4	12	n.d.	n.d.	30	n.d.	n.d.	75	
Fósforo	mg	43	119	n.d.	n.d.	100	n.d.	n.d.	275	
Microminerais										
Ferro	mg	0,2	0,08	40	n.d.	0,27	40	6,9	n.d.	
Zinco	mg	0,38	0,53	4	n.d.	2,0	5	2,5	3,0	
Cobre	µg	60	60	n.d.	n.d.	200	n.d.	n.d.	220	
Manganês	µg	7,0	21,0	n.d.	n.d.	3,0	n.d.	n.d.	600	
Iodo	µg	7,0	21,0	n.d.	n.d.	110	n.d.	n.d.	130	
Flúor	mg	0,02	0,02	n.d.	n.d.	0,01	n.d.	n.d.	0,5	
Selênio	µg	1520	960	45	n.d.	15	60	n.d.	20	
Cromo	mg	400	15000	n.d.	n.d.	200	n.d.	n.d.	5500	
Molibdênio	µg	2	22	n.d.	n.d.	2,0	n.d.	n.d.	3,0	
Cobalto	µg	0,1	n.d.	-	-	-	-	-	-	

Fontes: (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997; INSTITUTE OF MEDICINE, 2000; TRUMBO, 2001; INSTITUTE OF MEDICINE, 2006; PARK et al., 2007; GUO, 2014)

Nota: n.d.: não determinado. UL (*Tolerable upper intake level*), EAR (*Estimated average requirement*), AI (*Adequate intake*). Não foram estabelecidos um EAR ou IA para sódio e cobalto.

1.1.3 Compostos bioativos no leite materno e no leite de vaca

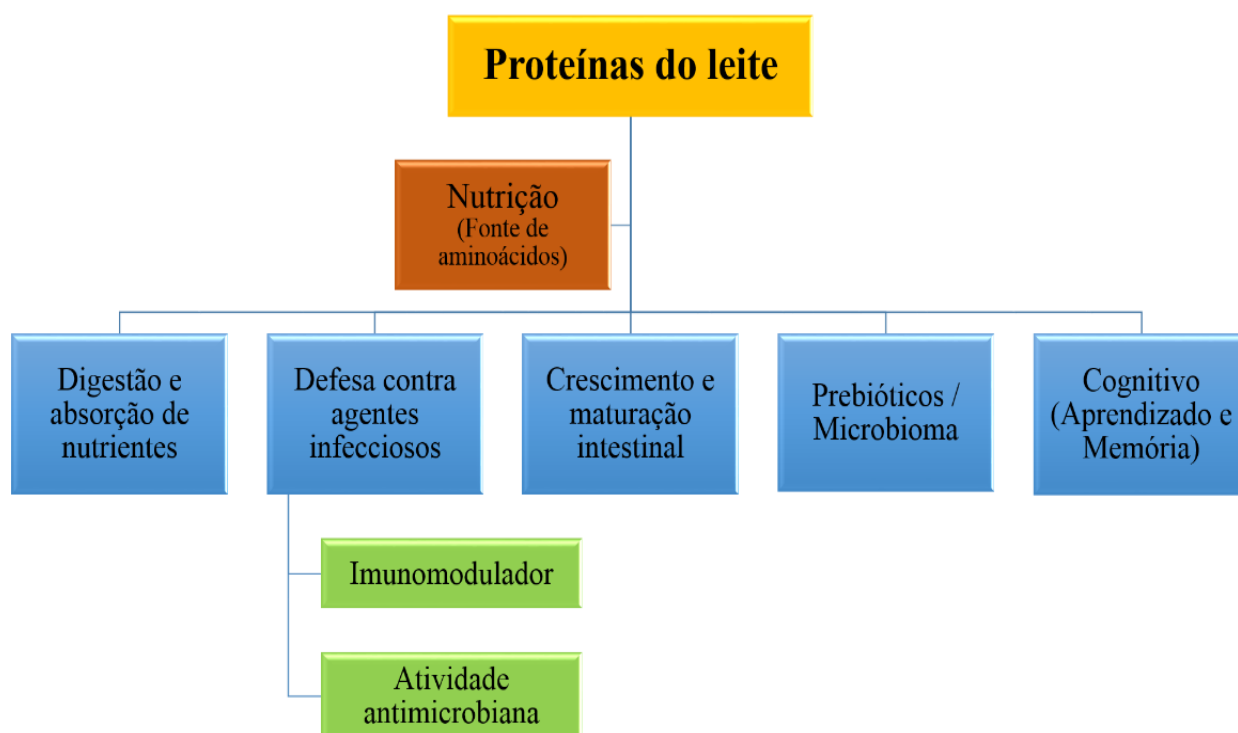
O LM contém não apenas nutrientes essenciais, mas também uma variedade de compostos com características bioativas específicas que suportam diferentes funções fisiológicas além da simples nutrição. Os compostos bioativos são definidos como compostos que “interferem em processos biológicos com reflexos na função e estrutura celular dos organismos, com um impacto direto na saúde” (BIESALSKI et al., 2009; BALLARD & MORROW, 2013). No LM, esses compostos vêm de uma variedade de fontes; alguns são produzidos e secretados pelo epitélio mamário, outros são produzidos por células transportadoras, enquanto outros são extraídos do soro materno e transportados pelo epitélio mamário por transporte mediado por receptores (BALLARD & MORROW, 2013; RAIKOS & DASSIOS, 2013). Além disso, a secreção do glóbulo de gordura no LM pelo epitélio mamário leva consigo uma coleção diversificada de proteínas e lipídios ligados à membrana da gordura do leite. Muitos desses compostos agem sinergicamente, corroborando com a teoria de que o consumo do LM é superior à suplementação com compostos individuais ou suas combinações (CAVALETTO et al., 2004; ILSI BRASIL, 2018). Alguns dos compostos bioativos do LM já estão bem identificados e estudados. No entanto, embora já tenham sido identificados, milhares de outros precisam ser testados clinicamente para comprovar seus efeitos fisiológicos na saúde e no desenvolvimento infantil. Dentre os variados compostos bioativos, existem aqueles derivados da proteína, os derivados dos carboidratos, os derivados dos lipídeos, aqueles do grupo das vitaminas e os derivados dos aminoácidos.

Nos últimos anos a composição das FIs tem sido aprimorada, não apenas para aumentar as semelhanças nutricionais com o LM, mas também para incluir compostos bioativos similares. Entre esses ingredientes, estão a adição de proteínas com características bioativas, como a α -La e a Lf, além de outros compostos como a taurina, folatos (ácido fólico e 5-MTHF), poliaminas, MFGM, ácidos graxos poliinsaturados (DHA e ARA), prebióticos e probióticos (ESPGHAN COMMITTEE ON NUTRITION et al., 2009; HERNELL, 2011; KOLETZKO et al., 2012; BALLARD & MORROW, 2013; PARK & NAM, 2015; RÊGO et al., 2018). Alguns desses compostos adicionados às FIs são controlados por agências regulatórias dos países nos quais são comercializados (ácido fólico, taurina, LC-PUFAs, prebióticos e probióticos, por exemplo) para a aprovação de segurança e eficácia de cada aditivo, enquanto outras (proteínas bioativas, MFGM, alguns folatos e poliaminas) ainda estão em estágio experimental de avaliação de sua eficácia fisiológica quando adicionadas às FIs (COMISSÃO EUROPEIA, 2006; FDA, 2014).

1.1.3.1 Compostos bioativos derivados das proteínas

As proteínas do LM exercem uma série de funções biológicas (Figura 5). Além de serem uma excelente fonte de aminoácidos, elas também exercem funções como: melhorar a biodisponibilidade de micronutrientes, estimular o crescimento e a maturação intestinal, defesa imunológica, modelar a microbiota e aprimorar o aprendizado e a memória (DONOVAN et al., 2019). Além das funções biológicas proveniente das proteínas intactas, outras funções decorrem a partir de peptídeos bioativos formados durante a digestão das caseínas e das proteínas soro (α -lactofina, β -lactofina, albutensina A, β -lactotensina, lactoferrina, lactoferrampin e outros), e dos glicanos liberados das glicoproteínas, conferindo assim mais complexidade às propriedades funcionais das proteínas.

Figura 5 - Propriedades funcionais das proteínas do leite humano



Fonte: (DONOVAN et al., 2019)

A CN é um dos principais componentes proteicos do leite e os peptídeos derivados das CNs apresentam diferentes propriedades bioativas. Estes peptídeos bioativos estão em estado ativo dentro da cadeia polipeptídica das CNs. O LM, como já mencionado anteriormente, consistem principalmente de β -CN e κ -CN. A κ -CN (19 kDa), ou mais provavelmente, um

fragmento obtido a partir da sua clivagem, o glicomacropéptido (GMP), apresentam diversos efeitos biológicos como atividades prebióticas, imunomoduladoras e inibição da adesão de patógenos às células intestinais (ILSI Brasil, 2018). Foi demonstrado que a κ -CN do LM pode impedir a fixação de *Helicobacter pylori* à mucosa gástrica humana, o que acaba por justificar a menor incidência de infecção por *H. pylori* em bebês amamentados (STRÖMQVIST et al., 1995). Em um estudo com macacos *rhesus* infantis infectados com *E. coli* enteropatogênica, foi demonstrado que o GMP bovino adicionado à fórmula administrada aos animais reduziu a gravidade da diarreia e também aproximou o microbiota intestinal ao de macacos amamentados (BRUCK et al., 2003).

A β -CN (27 kDa) forma uma grande variedade de fosfopeptídeos bioativos durante a digestão. Estes caseinofosfopeptídeos (CPPs) são considerados facilitadores da absorção intestinal de Ca e Zn, e solubilizadores de fosfato de cálcio (HANSEN et al., 1996). Experimentos em modelos animais mostraram aumento da absorção de Ca por CPPs de CN bovina, embora em humanos adultos não existam as mesmas evidências (TEUCHER, et al., 2006).

A α -La e a Lf são as principais proteínas do soro no LM. A α -La (14,2 kDa) é a proteína mais abundante no LM e contém altas concentrações de aminoácidos essenciais, principalmente a cisteína e o triptofano. A presença de cisteína na estrutura desta proteína está relacionada ao fortalecimento do sistema imunológico, enquanto os elevados níveis de triptofano ajudam a melhorar o sono, humor e o desenvolvimento cognitivo dos bebês (HARAGUCHI et al., 2006; ALMEIDA et al., 2013). Além disso, a α -La apresenta baixa alergenicidade, sendo constantemente utilizada no enriquecimento de FIs (PESO et al., 2012; SOLÉ et al., 2018). No epitélio mamário, a α -La e a galactosiltransferase formam a enzima lactosesintase, responsável pela catálise da reação de biossíntese para formação da lactose. Além disso, esta proteína tem um local de ligação específica para o Ca e outro local de ligação para oligoelementos essenciais, como Fe e Zn, facilitando sua absorção (SANDSTRÖM et al., 2008). A α -La do LM e a do LV compartilham um percentual relativamente semelhante de homologia (73,9%), assim como suas sequências de aminoácidos, sendo assim, a absorção de Fe demonstrou ser aumentada em macacos *rhesus* alimentados com FI com adição de α -La proveniente do LV (OLDAEUS et al., 1992; ILSI BRASIL, 2018).

A Lf (80 kDa) é a segunda proteína predominante no LM, e a mais estudada. É conhecida como uma proteína multifuncional, responsáveis por diversas funções, como: atividades antibacterianas e antivirais no intestino através de efeitos diretos sobre patógenos,

afetando a função gastrointestinal e imunológica (LÖNNERDAL et al., 2014). A razão pela qual a Lf pode exercer todas essas funções é o fato dela conter uma estrutura que a torna parcialmente resistente a ação de enzimas proteolíticas, sendo grande parte da Lf encontrada intacta no intestino de crianças amamentadas. A Lf intacta, se liga a receptores específicos que cobrem a superfície das células epiteliais intestinais, estimulando e aumentando a superfície da mucosa, conferindo melhor absorção de Fe e de outros nutrientes (SUZUKI et al., 2005; BUCCIGROSSI et al., 2007; LIAO et al., 2012). A Lf também pode exercer bioatividades que não são mediadas pela ligação ao seu receptor, como efeitos bacteriostáticos e bactericidas. A Lf intacta pode ter efeitos bacteriostáticos contra *Escherichia coli*. Esta propriedade decorre do fato de que a Lf apresenta uma alta afinidade por Fe, permitindo que ela o retenha, impedindo que haja disponibilidade para os patógenos que o requerem, além de extraí-lo das bactérias, impedindo sua utilização. Também apresenta capacidade bactericida frente a patógenos, como *Vibrio cholera* e *Streptococcus mutans* (QUEIROZ et al., 2013; LÖNNERDAL et al., 2014). Em um estudo desenvolvido por Vogel (2012), o autor demonstrou que os peptídeos da Lf (lactoferricina e lactoferrampina) podem ter atividades antibacterianas *in vitro* e *in vivo*. No entanto, não se sabe ao certo se esses peptídeos são formados durante a digestão normal. A Lf bovina está disponível comercialmente e demonstrou ser relativamente resistente à proteólise. Alguns estudos clínicos foram realizados utilizando a Lf bovina adicionada à FIs, entretanto, os resultados não demonstraram muito efeito sobre o status do Fe, a infecção e a microflora das fezes.

Recentemente foi relatado que muitas fontes comerciais de Lf bovina continham quantidades significativas de lipopolissacarídeos, que também tem afinidade pelos receptores da Lf, bloqueado assim suas bioatividades. Quando se tomou o cuidado de usar Lf bovina comercial sem a contaminação por lipopolissacarídeos, estudos *in vitro* tiveram resultados positivos quanto a bioatividade das Lf bovina, semelhantes às da Lf humana (LÖNNERDAL et al., 2011). Isso mostra que as bioatividades podem ser impedidas por contaminantes e que a pureza do composto bioativo adicionado à FI é de grande importância para que o efeito fisiológico esperado aconteça. Em outros estudos, no qual foi comparado o consumo de FIs com adição e o consumo sem a adição de Lf bovina, pesquisadores conseguiram demonstrar redução significativa da incidência de sepse em prematuros que receberam fórmulas suplementadas com a Lf bovina, menor prevalência de espécies de *Giardia*, assim como melhor crescimento, do que crianças que não receberam fórmulas suplementadas (OCHOA et al., 2008; MANZONI et al., 2009). Além das proteínas anteriormente citadas, o LM contém muitas outras

proteínas bioativas que também estão envolvidas na digestão, absorção e transporte de nutrientes, na defesa contra infecções, função imunológica e desenvolvimento, como demonstrado no Tabela 5.

Tabela 5 - Proteínas do leite humano associadas à sua função biológica

Função Biológica	Proteína Bioativa
Nutrição	α -CN β -CN κ -CN α -La
Digestão e absorção de nutrientes	α_1 -antitripsina Amilase
Enzimas	Lipase estimulada pelo sal biliar α -La
Proteínas transportadoras de nutrientes	β -CN (cálcio e fósforo) Proteína de ligação ao folato Haptocorina (vitamina B12) Lf (ferro)
Modulação intestinal	Fatores de crescimento Lf
Defesa imunológica	α -La κ -CN Lf Citocinas Haptocorrina Lactoperoxidase Lisozima Osteopontina IgA secretora
Prebiótico	α -La Lf Glicanos MFGM ⁽¹⁾
Desenvolvimento cognitivo	Lf MFGM ⁽¹⁾

Fonte: (BALLARD & MORROW, 2013; HASCHKE et al., 2017; DONAVAN, 2019)

Nota: ⁽¹⁾MFGM: proteínas bioativas (mucina-1, butirofilina, CD36, adipofilina e lactaderina) que são inseridas na membrana do glóbulo de gordura do leite (MFGM). CN (caseína), La (Lactalbumina), Lf (Lactoferrina), IgA (Imunoglobulina secretora).

O LV demonstrou ser uma fonte valiosa de compostos bioativos naturais. Algumas proteínas bioativas no LV são semelhantes ao LM, embora não sejam idênticas, mas podem fornecer algumas das atividades semelhantes às encontradas no LM (LÖNNERDAL, 2014). Entre esses, os peptídeos bioativos são os compostos mais estudados. Pesquisas provaram que

esses peptídeos exibem uma ampla variedade de funcionalidades fisiológicas, incluindo atividades antimicrobianas, anti-hipertensivas, antitrombóticas, antioxidantes, opióides, anti-apetitosas, imunomoduladoras, de ligação a minerais e promotoras de crescimento. No entanto, atualmente, a suplementação de FIs com esses peptídeos a partir de proteínas do LV não é uma realidade (PARK & NAM, 2015; SÁNCHEZ & VÁZQUEZ, 2017; SHAHIDI & ZHONG, 2008).

1.1.3.2 Compostos bioativos derivados dos aminoácidos

O LM contém poliaminas e aminas biogênicas que pertencem a um grupo denominado moléculas bioativas derivadas de aminoácidos. As poliaminas são compostos bioativos essenciais, e estão envolvidas na proliferação e diferenciação celular, assim como na síntese de DNA, RNA e proteínas. As poliaminas biologicamente ativas são espermina, espermidina e putrescina. Além de sua síntese endógena, elas também são fornecidas exogenamente através da dieta, sendo o LM, a primeira fonte de poliaminas exógenas para o recém-nascido. O LM contém níveis relativamente altos de poliaminas, principalmente espermina e espermidina, com menor quantidade de putrescina, que é sintetizada no epitélio mamário em lactação (PLAZAZAMORA et al., 2013; BÜYÜKUSLU, 2015). Entretanto sua concentração vai depender de vários fatores, como o tempo de coleta do LM, o estágio da lactação, a mama escolhida e a ingestão alimentar de poliaminas materna (ATIYA et al., 2014; GÓMEZ-GALLEGO et al., 2017). Há também uma variação na concentração de poliaminas no LM de bebês nascidos prematuros e a termo. Em um estudo comparativo, as concentrações de espermina, espermidina e putrescina nas amostras de LM de mães de bebês nascidos prematuros foram 167,7 nmol/dl, 615,5 nmol/dl, 165,6 nmol/dl, respectivamente. Em contrapartida nas amostras de LM de mães com bebês nascidos a termo, as concentrações foram 173,4 nmol/dl, 457,5 nmol/dl, 82,4 nmol/dl, respectivamente. Desta forma, como observado, a espermina permaneceu praticamente inalterada. Esse resultado é consistente com o maior teor de proteínas no LM de mães de que tiveram seus bebês nascidos prematuramente, pois é levado em consideração quando o papel das poliaminas na estimulação da síntese de proteínas (BÜYÜKUSLU, 2015).

Bjelakovic e colaboradores (2012) investigaram o metabolismo das poliaminas no colostro (1º e 2º dia) e no LM maduro (30º dia de lactação) medindo as atividades das enzimas poliamina oxidase (PAO) e diamina oxidase (DAO), necessárias para o catabolismo da poliamina, bem como determinando os níveis de malondialdeído (MDA), o produto final da

biodegradação de poliamina. Os autores encontraram um aumento significativo da atividade do PAO, bem como uma diminuição acentuada da atividade do DAO e dos níveis de MDA durante o primeiro mês de lactação. Isto explica por que as maiores concentrações de espermina e espermidina no LM são detectadas nos primeiros dias de lactação, demonstrando assim a grande importância desses compostos bioativos na alimentação do recém-nascido.

A ingestão de poliaminas via LM tem um papel essencial no desenvolvimento intestinal e na maturação de órgãos associados, como fígado e pâncreas, diferenciação e desenvolvimento do sistema imunológico e colonização microbiana do intestino (GÓMEZ-GALLEGO et al., 2012; PLAZA-ZAMORA et al., 2013; BÜYÜKUSLU, 2015). Além disso, as poliaminas também podem prevenir alergias alimentares em lactentes, diminuindo a permeabilidade da mucosa a proteínas antigênicas (JACOBI & ODLE, 2012).

Em um estudo desenvolvido por Gómez-Gallego et al. (2012), os autores avaliaram o impacto da suplementação da FI com uma mistura de diferentes poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) nas composições da microbiota neonatal em camundongos, nas mesmas concentrações presentes no LM. Os resultados demonstraram o efeito potencial das poliaminas na composição microbiana intestinal. Embora tenham sido evidenciados os efeitos positivos das poliaminas na saúde, são necessários mais estudos para verificar esse efeito em bebês humanos.

Estima-se que a concentração de poliaminas nas FIs seja cerca de 10 vezes menor do que aquela observada no LM (RUIZ-CANO et al., 2012). Embora a concentração de poliaminas seja maior no LM em comparação às FIs para lactentes, a função bioativa dessas substâncias no crescimento intestinal e na permeabilidade epitelial em neonatos e lactentes é uma hipótese atraente, que, no entanto, permanece altamente controversa. O aumento significativo da concentração de poliamina no LM durante a primeira semana de lactação também levanta a questão do impacto fisiológico dessas substâncias no recém-nascido. É mais provável que as mudanças precoces na concentração de poliamina reflitam apenas a atividade metabólica aumentada e a taxa de síntese proteica da glândula mamária (PLAZA-ZAMORA et al., 2013; GÓMEZ-GALLEGO et al., 2017).

1.1.3.3 Compostos bioativos derivados das vitaminas

Dentre os compostos bioativos relacionados às vitaminas, temos os folatos e a vitamina do complexo B (B9), pois esses compostos não são sintetizados no organismo humano, e sua

concentração no LM depende da dieta materna. Na dieta, o folato provém principalmente de alimentos de origem vegetal ou de microrganismo. Os folatos são derivados do tetraidrofolato (THF), que é a forma mais oxidada que consiste em um anel de pteridina, um para-aminobenzoato e uma cauda de glutamato. Outros folatos diferem no comprimento da cauda do glutamato, variando de um glutamato (monoglutamato) a aproximadamente oito L-glutamato ligado (poliglutamatos) e o carbono único ligado à molécula (metil-, formil-, metileno-, metenil-, ou formimino-) (CAMPOS-GIMÉNEZ et al., 2017).

Os folatos estão envolvidos em diferentes processos bioquímicos e sua deficiência contribui para os defeitos do tubo neural em recém-nascidos, doenças neurológicas, deficiência em vitamina B12 que têm consequências negativas em um cérebro em desenvolvimento. Além disso, os folatos são necessários para a eritropoiese, participando da formação e maturação dos glóbulos vermelhos na medula óssea. Desta forma, a ingestão insuficiente de folatos está associada à anemia megaloblástica (HERMOSO et al., 2011; OHRVIK & WITTHOFT, 2011; CZEIZEL et al., 2013). Por outro lado, o excesso de folatos em alimentos fortificados, consumidos por indivíduos já com deficiência de vitamina B12, pode aumentar o risco de danos neurológicos, mascarando as manifestações hematológicas da deficiência de vitamina B12 (AMI et al., 2016).

A vitamina B9 (ácido pteroil-monoglutâmico) é a forma mais estável e facilmente absorvido entre os folatos, e, por esse motivo, é usado na maioria dos suplementos, FIs e alimentos fortificados (CRIDER et al., 2011), no entanto, deve-se levar em consideração as perdas durante o processo de fabricação e estocagem, até mesmo da vitamina adicionada. Como a absorção dos folatos varia de acordo com sua forma química, os equivalentes dietéticos do folato (EDF) são definidos como $1 \text{ EDF} = 1 \mu\text{g de folato alimentar} = 0,6 \mu\text{g de ácido fólico de alimentos fortificados}$. De acordo com a EFSA (2014), uma ingestão de folato de $65 \mu\text{g de EDF/dia}$ e $80 \mu\text{g de EDF/dia}$ provou ser adequada para a maioria dos bebês no primeiro semestre e na segunda metade do primeiro ano de vida, respectivamente.

O ácido fólico é a forma aprovada para uso em FIs, e sua adição é obrigatória, devendo conter no mínimo $10 \mu\text{g}/100 \text{ kcal}$ e no máximo $50 \mu\text{g}/100 \text{ kcal}$ de ácido fólico (COMISSÃO EUROPEIA, 2006; BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b; EFSA, 2014; FDA, 2014). Embora o 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF) e o ácido folínico, duas outras formas de folato possam ser usadas para fortificação em tipos de alimentos específicos, esses folatos atualmente não são aprovados para uso em FIs (FDA, 2014).

1.1.3.4 Membrana do glóbulo de gordura do leite

A MFGM é uma estrutura composta de lipídios e proteínas que circundam o glóbulo de gordura do leite secretado pelas células epiteliais alveolares de humanos e outros mamíferos. MFGM e seus constituintes são uma importante fonte de compostos bioativos. Nos últimos anos, vêm ganhando atenção de pesquisadores da área de nutrição infantil, que têm demonstrado grande interesse por seus benefícios nutricionais, fisiológicos e para a saúde. Estudos clínicos em humanos e animais relataram efeitos positivos atribuídos principalmente aos componentes do MFGM, como na saúde imunológica e gastrointestinal, no desenvolvimento do cérebro e na função cognitiva, demonstrando grande aplicabilidade no enriquecimento de FIs (HERNELL et al., 2016; NIETO-RUIZ et al., 2019; ORTEGA-ANAYA & JIMÉNEZ-FLORES, 2019).

A fração lipídica do LM constitui 3 a 5% de sua composição, sendo representada principalmente por glóbulos em formas esféricas, que consistem de um “núcleo” de triglicerídeos (95-98% dos lipídeos totais do leite) circundado por uma membrana estrutural de três camadas composta por uma mistura complexa de lipídios polares (fosfolipídios e esfingolipídios) e lipídios apolares (colesterol e cerebrosídeos), proteínas (principalmente glicoproteínas) e carboidratos (gangliosídeos) (DEWETTINCK et al., 2008). Os constituintes da MFGM, assim como outros compostos do LM, também são influenciados pelo período da lactação, bem como pelas condições ambientais, assim como observado na concentração de lipídeos do LM (MANONI et al., 2020).

O MFGM presente no LM e no LV são semelhantes em relação aos lipídios polares, entretanto com moléculas com características diferentes, em que o MFGM do LM contém mais esfingomielina do que do LV, entretanto apresentam a mesma composição fosfolipídica (KOLETZKO, 2016). O MFGM do LV contém quantidades consideráveis de ácidos graxos saturados de cadeia curta (linoléico) e quase nenhum outro PUFAs. No entanto, o MFGM do LM é rico em PUFAs, como o DHA (LOPEZ & MÉNARD, 2011; KOLETZKO, 2016). Entre os lipídios apolares, o colesterol funciona como um bloco de construção para MFGM, afetando o desenvolvimento da mielina nos sistemas nervosos central e periférico. Ajuda como substrato para a síntese de ácidos biliares, lipoproteínas, vitamina D, hormônios e oxisteróis derivados do colesterol, lipídios e a homeostase da glicose (KOLETZKO, 2016).

Os carboidratos presentes no MFGM estão na forma de gangliosídeos. Os gangliosídeos estão envolvidos em numerosos processos de desenvolvimento neuronal, como a mielinização

e manutenção da integridade axonal, no desenvolvimento, diferenciação e maturação neuronal, na transmissão de impulsos nervosos, e nos processos de formação de memória (MCJARROW, et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2016).

As proteínas que compõem o MFGM, embora quantitativamente represente apenas 1% a 2% do conteúdo total de proteínas do LM, correspondem a mais de 400 proteínas com propriedades bioativas e potencialmente benéficas, especialmente sobre o mecanismo de defesa da criança. As principais proteínas identificadas até o momento como parte da MFGM do LM são: xantina oxidase, adipofilina, proteína de ligação de ácido graxo e proteínas fortemente glicosiladas, como as mucinas, lactaderina, CD36 e butirofilina (LOPEZ & MÉNARD, 2011; LEE et al., 2018). Muitas dessas proteínas como mucinas, lactaderina e butirofilina encontram-se na forma de proteínas glicosiladas (ligação entre moléculas de glicose e aminoácidos de uma proteína). Essas glicoproteínas desempenham papéis importantes nos mecanismos de defesa da microbiota intestinal, agindo como receptores bacterianos e virais específicos que protegem os bebês da ligação de patógenos a receptores glicano na superfície das células da mucosa, regulando e melhorando a microbiota intestinal infantil (LEE et al., 2018). Um estudo comparativo entre MFGM do LM e do LV demonstrou que MFGM presente no LV possui quantidades semelhantes de proteínas, que incluem mucina-1, xantina oxidase, CD36, butirofilina, adipofilina, lactaderina e proteína de ligação a ácidos graxos (CAVALLETTO et al., 2008; MANONI et al., 2020). Além disso, foi identificado que as proteínas do soro do LV, especialmente β -Lg, Lf e Igs, estão comumente associadas a MFGM (ALMEIDA et al., 2013; FONTECHA et al., 2020).

As FIs tradicionais são desprovidas de MFGM, pois a gordura do LV é substituída por óleos vegetais (TIMBY et al., 2017). Dada as semelhanças entre MFGM do LM e do LV e as propriedades bioativas dos componentes presentes na MFGM do LV observadas em estudos clínicos, a suplementação de FIs com MFGM do LV seria uma boa alternativa. Embora já exista um protótipo de FI com isolados de MFGM do LV, sua inclusão no processo de fabricação ainda não é realizada em grande escala, por isso ainda não foi adotada pela indústria de laticínios. Além disso, não há regulamentação para sua adição às FIs (DEWETTINCK et al., 2008).

1.1.3.5 Compostos bioativos derivados dos lipídeos

Uma vez digeridos e absorvidos, os lipídios do leite são os principais contribuintes para os efeitos benéficos do LM. Dentre as atividades benéficas dos lipídios do leite incluem, propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória e imunossupressora. Os PUFAs, ALA (ALA-18:3 ω -3) e o LA (LA-18:3 ω -6) são os compostos bioativos que mais se destacam pelas suas funções no organismo, no entanto, dependem da dieta materna (KOLETZKO et al., 2008). O ALA e LA são precursores de LC-PUFAs. Uma vez no organismo, ALA participa de uma cadeia metabólica que resulta em EPA e depois em DHA, enquanto o LA é convertido em ARA (KOLETZKO, 2016). A conversão de ALA em EPA e DHA depende do metabolismo individual de cada mãe. Estima-se que a conversão de ALA em EPA é da ordem de 0,2% a 6% e que, aproximadamente, 63% do EPA é convertido em DHA. Portanto, a formação de DHA é maior que a do EPA (LAVIALLE et al., 2010).

Tanto o DHA quanto o ARA estão presentes em lipídios da membrana neuronal do cérebro, da mielinização das fibras nervosas e da retina, sendo que o DHA é o mais abundante no cérebro, constituindo cerca de 40-50%, assim como na retina (40%). Já o EPA desempenha papel mais relevante na saúde cardiovascular e imunológica. As concentrações desses ácidos acumulam na retina, cérebro e outros tecidos neuronais durante o último trimestre da gravidez e no recém-nascido e lactente nos primeiros 2 anos de vida, sendo fornecidos através do LM (ILSI BRASIL, 2018). Estas evidências demonstram a importância da ingestão adequada de PUFAs durante a gestação e lactação, períodos críticos para o desenvolvimento cerebral da criança.

De acordo com estudos clínicos desenvolvidos por diferentes autores (SCHULZKE et al., 2011; QAWASMI et al., 2012; QAWASMI et al., 2013), lactentes alimentados com FIs sem adição de LC-PUFAs apresentam níveis significativamente mais baixos de DHA e ARA no plasma ou glóbulos vermelhos em comparação com aqueles que foram amamentados ou alimentados com FIs suplementada com DHA e ARA. No entanto, as concentrações de DHA no cérebro de bebês amamentados demonstraram serem maiores do que no cérebro de bebês alimentados com fórmula. Uma meta-análise de ensaios clínicos randomizados foram realizados para avaliar os efeitos da suplementação de DHA e ARA em FIs no desenvolvimento cognitivo e na acuidade visual (QAWASMI et al., 2012; QAWASMI et al., 2013). No que diz respeito aos efeitos sobre a cognição infantil, a suplementação não demonstrou efeito

significativo; por outro lado, as evidências demonstraram um efeito significativo na acuidade visual dos bebês que foram alimentados com fórmulas contendo DHA e ARA.

A presença de LC-PUFAs no LM recebeu considerável atenção, porque muitos dos efeitos bioativos no início da vida são mediados por esses AGs essenciais. Considerando que os bebês não podem sintetizar LC-PUFA, o enriquecimento de FIs com DHA e ARA é uma maneira eficaz de promover os benefícios de crianças que não podem ser amamentadas (WEISER et al., 2016). Várias fontes de lipídeos podem ser utilizadas no enriquecimento, como exemplo: óleos de peixe, algas, fungos, ovos e triglicérides sintetizados (SILVA et al., 2007). As algas são os principais produtores de DHA na cadeia alimentar e duas fontes de óleo de algas contendo DHA estão disponíveis para a fortificação de FIs e enriquecimento de outros alimentos (DHA Single Cell Oil-T e DHA Single Cell Oil-S). No entanto, apenas o DHA Single Cell Oil-T (DHASCO-T) foi reconhecido como adequado para suplementação de FIs pela FDA (ILSI BRASIL, 2010). A suplementação em FIs deve ser vista com cautela, pois dependendo das quantidades e fonte de LC-PUFAs utilizados, pode-se inibir a conversão de LA em ARA ou o alto teor de EPA pode competir com o ARA pela incorporação de fosfolipídios nos tecidos. Portanto, as fórmulas devem conter quantidades próximas daquelas encontradas no LM (SILVA et al., 2007).

1.1.3.6 Compostos bioativos derivados dos carboidratos

Os oligossacarídeos estão entre os compostos bioativos não nutritivos mais importantes, pois compensam os atrasos no desenvolvimento do trato gastrointestinal infantil. Os HMOs representam quantitativamente um dos principais componentes do LM, atuando como um prebiótico, e indiretamente como um probiótico. Os HMOs agem como promotores de uma flora intestinal desejável, uma vez que são substratos para bactérias benéficas no intestino, onde estimulam o crescimento de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp (VAN DEN BROEK et al., 2008; GUO, 2014). Além disso, os HMOs podem atuar como análogos de receptores de células epiteliais, atuando como ligantes competitivos para bactérias patogênicas e suas toxinas, impedindo sua adesão ao epitélio do cólon (ROBERFROID et al., 2010; MAVROUDI & XINIAS, 2011; TANAKA & NAKAYAMA, 2017).

A maioria das HMOs é excretada nas fezes, porém, parte deles pode ser absorvida pela circulação, onde modula a imunorreatividade, impedindo a resposta alérgica ou a hipersensibilidade alimentar (GARWOLIŃSKA et al., 2018). De acordo o estudo desenvolvido

por Goehring et al., (2014), os autores identificaram que uma pequena parte dos HMOs ingeridos foram absorvidos intactos na circulação e excretados na urina e suas concentrações nesses fluidos se correlacionaram com os níveis encontrados no LM correspondente. No entanto, pouco ainda se sabe sobre os níveis plasmáticos de HMOs e sua bioatividade, além do sistema digestivo. A absorção e o metabolismo de HMOs individuais podem ser amplamente dependentes da sua estrutura química (GOEHRING et al., 2014).

O efeito prebiótico observado nos HMOs também pode ser observado em outros glicanos bioativos, como as glicoproteínas e os glicolípídeos. Ambos também são reconhecidos como responsáveis pelo desenvolvimento da microbiota, tendo aplicação direta na prevenção de doenças como enterocolite necrosante. Os glicanos ligados a Lf, como já mencionado, conferem atividades antibacterianas e antivirais no intestino através de efeitos diretos sobre patógenos, afetando a função gastrointestinal e imunológica (LÖNNERDAL et al., 2014). Comparando ao LM, o LV não possui glicanos específicos que possam ajudar no desenvolvimento infantil (BRAEGGER et al., 2011; PACHECO et al., 2015; SABATER et al., 2016).

A lactose, por sua vez, além de facilitar a absorção de Ca, participa da composição de lactulose e GOS, e promove a colonização intestinal de bactérias probióticas (NOVAK et al., 2001). Os GOS provenientes da lactose também são usados como probióticos promotores de crescimento, e têm ação inibitória de ligação de bactérias como *E. coli enteropatogênica*, *Campylobacter jejunii* e *Streptococcus pneumoniae* às células alvo intestinais (ILSI BRASIL, 2018).

Os probióticos são considerados bactérias vivas que, quando ingeridas em doses definidas, afetam o hospedeiro de maneira benéfica, melhorando seu equilíbrio microbiológico intestinal. Os *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. representam as bactérias probióticas mais comuns encontradas no intestino infantil (BALLARD & MORROW, 2013). Por meio de um mecanismo chamado exclusão competitiva, os microorganismos probióticos permitem que a microbiota intestinal seja modulada, impedindo a colonização da mucosa por microorganismos potencialmente patogênicos, através da competição por locais de adesão e nutrientes e/ou pela produção de compostos antimicrobianos (SLAVIN, 2013; BERGMANN et al., 2014). Os microorganismos probióticos também parecem influenciar a biodisponibilidade e digestibilidade de lipídios e proteínas, devido à liberação de várias enzimas no lúmen intestinal (NAGPAL et al., 2012). De acordo com evidências demonstradas por Boesten et al. (2011), o número de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. no trato gastrointestinal de bebês

amamentados, representou mais de 90% da microbiota intestinal nos primeiros dias de vida, comparado com bebês que receberam FI, no qual essas bactérias corresponderam a 40 a 60%.

1.1.4 Fórmulas infantis

As FIs são produtos desenvolvidos e comercializados com o intuito de substituir ou complementar o LM (WHO, 1981; WHO, 2007). O uso de FIs é recomendado na impossibilidade do aleitamento materno, seja por questões relacionadas a saúde da mãe, como por exemplo serem portadoras do vírus HIV, mães usuárias de droga ou que usam medicamentos incompatíveis com a amamentação, seja por questões relacionadas a saúde do bebê, como, lactentes menor de seis meses com crescimento e desenvolvimento inadequado ou que tenham intolerância a lactose, ou até mesmo, uma escolha da própria mãe, em não querer amamentar por questões pessoais (COCCO et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013; MARIN & NEVES, 2013; SBP, 2019).

No final do século XIX e início do século XX surgiram as primeiras indústrias de substitutos do leite, desenvolvidas com o objetivo de encontrar um substituto para o LM. No entanto, a primeira fórmula à base de LV foi criada em 1867 pelo químico alemão Von Liebig. Inicialmente era comercializada na forma líquida, e mais tarde em pó, constituída além do LV, por farinha de trigo e de malte e bicarbonato de potássio (LOPEZ & JUZWIAK, 2003). O consumo dessas fórmulas no Brasil cresceu com o processo de industrialização, principalmente com a importação desse produto após a primeira guerra mundial (SOUZA & ALMEIDA, 2004).

As FIs foram sendo modificadas nos últimos anos, em virtude de novos conhecimentos sobre nutrientes que devem ser utilizados em maior ou menor quantidade ou acerca de novos componentes que poderiam ser incorporados às formulações (ROCHA, 2008). Este avanço tecnológico das fórmulas industrializadas permitiu elaborar produtos que compensam certas deficiências digestivo-absortivas, reações alérgicas e até mesmo contribuem para diminuir a desnutrição (WEFFORT, 2006). Desta forma, vários avanços foram alcançados com a produção de FIs mais adequadas às necessidades específicas do lactente. Fórmulas com acréscimo de nucleotídeos, prebióticos, probióticos e PUFAs, isentas de lactose, menor teor de proteína ou proteínas hidrolisadas, constituem os principais substitutos do LM que são hoje comercializados nos estabelecimentos comerciais (PROGRAMA PEDIÁTRICO, 2000). Crianças com até seis meses de vida devem utilizar a FIs de partida e, a partir desta idade,

recomenda-se o uso de FIs de seguimento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2003).

O mercado global de nutrição infantil foi estimado em US\$ 20 milhões em 2018 e deve chegar a US\$ 25 milhões até o final de 2025 (WHO, 2018). O mercado mundial de FIs representa 40% de todo o mercado de alimentos para crianças, 33% deste mercado é compartilhado pela Europa e América do Norte e a maior parcela pela Ásia. Apesar da recessão econômica que o Brasil vivenciou nos últimos anos, a categoria de alimentos para bebês ainda é considerada subdesenvolvida em termos per capita, quando comparada a outros países da América Latina, o que permite espaço para crescer. Embora as FIs ainda sejam vistas como uma categoria de alto valor agregado no Brasil, as mães brasileiras estão cada vez mais informadas sobre a importância de se optar por um produto que substitua com segurança o aleitamento materno e confiam ter a composição de nutrientes necessários para o desenvolvimento de seu bebê.

A composição do LM é utilizada para estimar as necessidades nutricionais do lactente e orientar na composição das FIs. Desta forma, as FIs foram desenvolvidas para se assemelhar ao máximo a composição do LM, reproduzindo respostas fisiológicas próximas à de uma criança amamentada. A FI é um produto à base de LV ou outros animais, ou uma mistura dos mesmos e/ou outros ingredientes no qual provaram ser adequados para a alimentação infantil. O LV é a matéria-prima mais utilizada por ter o menor custo e facilidade de acesso. Dentre os processos tecnológicos usados para assemelhar à composição das FIs à base de LV com a composição nutricional do LM, podemos citar: adequar a proporção de proteínas em relação a CNs e as proteínas do soro; diminuir os teores de Na, Cl⁻, K e P; melhorar a quantidade de carboidratos, AG essenciais (ALA e LA), vitaminas (C, D e E), e alguns minerais (Fe, Zn, Cu e Se) (CASTILHO & BARROS FILHO, 2010; GUO et al., 2014).

A composição das FIs são específicas para a necessidade de cada lactente, e devem ser considerados fatores como a faixa etária, a classificação do recém-nascido, além de situações especiais de saúde, como a presença de alergias, intolerância à lactose, refluxo e outras condições patológicas. Ademais, a segurança nutricional e a conformidade das FIs devem ser demonstradas cientificamente para apoiar o crescimento e o desenvolvimento infantil. Com base no conhecimento científico vigente e nos padrões internacionais existentes, os requisitos de composição instituídos para FIs para lactentes (0 a 6 meses de idade), FIs de seguimento para lactentes (6 a 12 meses de idade) e para crianças de primeira infância (1 a 3 anos de idade),

devem ser seguros e eficazes para as faixas etárias a que se destinam, de forma a garantir seu adequado crescimento e desenvolvimento (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b).

Internacionalmente, os componentes nutricionais necessários para as FIs são definidos pelo Codex Alimentarius (CODEX), um programa conjunto de padrões alimentares supervisionado pela FAO e pela OMS, que tem como objetivo estabelecer as normas, códigos de práticas e diretrizes internacionais na área de alimentos. Sendo que de uma forma geral, os países também podem definir individualmente diretrizes adicionais. A Comissão do CODEX juntamente com especialistas da sociedade europeia de gastroenterologia pediátrica, hepatologia e nutrição (ESPGHAN), iniciaram um processo de consulta com a comunidade científica internacional para fornecer uma proposta sobre os níveis de nutrientes adequados nas FIs. Com base na análise científica e na tomada de decisões, estabeleceram os valores mínimos e máximos (Tabela 6). A legislação referente às FIs produzidas e comercializadas no Brasil foram criadas pelo Ministério da Saúde, baseando-se nas recomendações do CODEX, e são monitoradas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Atualmente as FIs são regulamentadas pelas seguintes resoluções, que estabelecem os requisitos mínimos de identidade, composição, qualidade e segurança:

- I. Resolução RDC n. 43/2011 - Regulamento Técnico para fórmulas infantis para lactentes.
- II. Resolução RDC n. 44/2011 - Regulamento Técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância.
- III. Resolução RDC n. 45/2011- Regulamento Técnico para fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas (Alterada pela RDC n°48/2014).
- IV. Resolução RDC n. 42/2011 - Regulamento Técnico de compostos de nutrientes para alimentos destinados a lactentes e a crianças de primeira infância (Alterada pela RDC n°45/2014).
- V. Resolução RDC n. 46/2011 - Regulamento Técnico de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia para fórmulas infantis destinadas a lactentes e crianças de primeira infância. Este regulamento se aplica às fórmulas infantis para lactentes, às fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância, às fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas, às fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e aos alimentos similares especialmente formulados para lactentes e crianças de primeira infância comercializados no país (Alterada pela RDC n°49/2014).

Alguns pontos tratados dentro das resoluções lançadas em 2011 foram alterados em 2014 pelas resoluções RDC n° 45, 48 e 49 de 2014 e em 2018 pela RDC n° 241, que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.

A RDC n° 42, de 19 de setembro de 2011, foi alterada em parte pela RDC n° 45, de 25 de setembro de 2014. Este regulamento estabelece a lista dos compostos de nutrientes que podem ser adicionados para fins especiais nas FIs destinadas a lactentes e a crianças de primeira infância. Estes compostos de nutrientes devem ser comprovadamente seguros e adequados para o uso a que se destinam, devendo ser demonstrado por meio de estudos adequados com animais e/ou humanos, que estes compostos estão biologicamente disponíveis, e sua estabilidade deve ser demonstrados por meio de critérios cientificamente reconhecidos (BRASIL, 2014b).

A RDC n° 43, de 19 de setembro de 2011, dispõe sobre o regulamento técnico para FIs para lactentes, destinadas as necessidades nutricionais dos lactentes saudáveis durante os primeiros seis meses de vida sendo classificada pelos fabricantes como FI de Fase 1 (“Fórmula infantil para lactentes”). Este regulamento tem como objetivo estabelecer os requisitos mínimos de identidade, composição, qualidade e segurança a que devem obedecer essas fórmulas. As quantidades mínimas e máximas de nutrientes que as FIs para lactentes devem conter estão descritas na tabela 6 (BRASIL, 2011a).

A RDC n° 44, de 19 de setembro de 2011, dispõe sobre o regulamento técnico para FIs de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância, sendo classificada pelos fabricantes como FI de Fase 2. São indicadas para lactentes a partir do sexto mês de vida até 12 meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias) e para crianças de primeira infância saudáveis (crianças de 12 a 36 meses). Este regulamento tem como objetivo estabelecer os requisitos mínimos de identidade, composição, qualidade e segurança a que devem obedecer às fórmulas infantis de Fase 2. As quantidades mínimas e máximas de nutrientes na qual devem estar presentes estão descritas na tabela 6 (BRASIL, 2011b).

Tabela 6 - Níveis mínimos e máximos de nutrientes em 100 kcal recomendados por especialistas (ESPGHAN), e os níveis nutricionais descritos na legislação brasileira vigente que as fórmulas infantis destinadas à lactentes (Fase 1) e fórmulas infantis de seguimento destinadas para lactentes (Fase 2)

Nutrientes	Unid.	ESPGHAN		Fase 1		Fase 2	
		Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Valor Energético	kcal	60	70	60	70	60	70
Carboidratos	g	9,0	14,9	9,0	14,0	9,0	14,0
Lactose	g	-	-	4,5	-	4,5	-
Proteína	g	1,8	3,0	1,8	3,0	1,8	3,5
Ácido Linoleico	mg	0,3	1,2	300	1400	300	1400
Ácido α -linolênico	mg	50	-	50	-	50	-
Sódio	mg	20	60	20	60	20	60
Cálcio	mg	50	140	50	-	50	-
Ferro	mg	0,3	1,3	0,45	1,3	0,9	2,0
Potássio	mg	60	160	60	180	60	180
Cloreto	mg	50	160	50	160	50	160
Fósforo	mg	25	90	25	-	25	-
Magnésio	mg	5	15	5	-	5	-
Iodo	μ g	10	50	10	-	10	-
Cobre	μ g	35	80	35	-	35	-

Continua

Continuação

Nutrientes	Unid.	ESPGHAN		Fase 1		Fase 2	
		Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Zinco	mg	0,5	1,5	0,5	-	0,5	-
Selênio	µg	1,0	9	1	-	1	-
Manganês	µg	1,0	50	1	-	1	-
Vitamina A	µg	60	180	60	180	60	180
Vitamina D	µg	1,0	2,5	1	2,5	1	3
Vitamina E	mg	0,5	5	0,5	-	0,5	-
Vitamina C	mg	8	30	10	-	10	-
Vitamina K	µg	4	25	4	-	4	-
Niacina	µg	300	1500	300	-	300	-
Vitamina B6	µg	35	175	35	-	35	-
Ácido Pantotênico	µg	400	2000	400	-	400	-
Vitamina B12	µg	0,1	0,5	0,1	-	0,1	-
Biotina	µg	1,5	7,5	1,5	-	1,5	-
Colina	mg	7	50	7	-	7	-
Taurina	mg	-	12	-	12	-	12
L-Carnitina	mg	1,2	-	1,2	-	-	2

Fonte: (Opinion of the SCF, 2003; EC, 2006; BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b)

Existem também FIs específicas para crianças que apresentam alergia ou intolerância às proteínas do LV. Estas fórmulas são regulamentadas pela RDC nº 45 de 25 de setembro de 2011, que foi alterada pela RDC nº 48 de 25 de setembro de 2014 (BRASIL, 2014a). São exemplos de FIs destinadas a necessidades específicas: fórmula sem lactose, fórmula à base de hidrolisado de proteína, fórmula à base de aminoácidos, fórmula destinada a recém-nascidos pré-termo, fórmula de triglicérido de cadeia média, fórmula com baixo teor de fósforo, fórmula enriquecida com proteínas e fórmulas lácteas para indivíduos com erros inatos de metabolismo são exemplos de FIs para necessidades especiais (HONG, 2018). Dentre as formulações citadas, apenas as FIs sem lactose, FIs à base de hidrolisado de proteína e FIs destinadas a recém-nascidos pré-termo são comercializadas no Brasil.

A RDC nº 46, de 19 de setembro de 2011, alterada pela RDC nº 49 de 25 de novembro de 2014, dispõe sobre aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia, estabelecendo seus limites máximos em FIs destinadas a lactentes, crianças de primeira infância e alimentos similares especialmente formulados para lactentes e crianças de primeira infância comercializados no país (BRASIL, 2014c).

A RDC nº 241, de 26 de julho de 2018, dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Sendo assim a resolução as RDC nº 43, 44 e 45/2011, passa a vigorar acrescido desta resolução. O uso de probióticos em FIs requer a comprovação da sua segurança e benefícios à saúde. Sua comprovação requer a caracterização e identificação da linhagem do microrganismo, por meio da apresentação de documentos técnicos ou estudos científicos (BRASIL, 2018).

Quanto à rotulagem, é estabelecido que a informação nutricional deve ser declarada por 100 g ou 100 mL do alimento tal como exposto à venda, bem como por 100 mL do alimento pronto para consumo de acordo com as instruções do fabricante. O rótulo das FIs para lactentes e de FIs de seguimento para latentes deve conter as seguintes informações: I - as fontes de proteína do produto de forma clara; II - a frase “não contém leite ou produtos lácteos” ou frase equivalente, quando o produto não contiver leite ou qualquer outro derivado do leite; III - instruções adequadas de uso, preparo e conservação do produto, incluindo informações sobre higiene das mãos e superfícies de trabalho e necessidade de esterilização dos utensílios, de acordo com as recomendações atualizadas da OMS; IV - instrução clara de que o produto deve ser preparado com água fervida e posteriormente resfriada a temperatura não inferior a 70°C, para produtos que necessitam de reconstituição; V - o tempo médio de espera após a fervura para atingir a temperatura de diluição de 70°C; VI - instruções sobre a importância de testar a

temperatura da fórmula antes de administrá-la, a fim de evitar queimaduras; VII - instruções sobre a importância do consumo imediato da fórmula reconstituída e a informação de que, quando necessário o preparo com antecedência do produto, a fórmula reconstituída deve ser refrigerada a uma temperatura menor que 5°C por no máximo 24 horas; VIII - advertência de que os restos do produto preparado devem ser descartados; IX - instruções claras ilustrando o método de preparação do produto; X - advertência sobre os perigos à saúde decorrentes do preparo, armazenamento e uso inadequados; e XI - instruções adequadas sobre a conservação do produto após abertura da embalagem.

A NBCAL (Norma brasileira de comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância, bicos, chupetas e mamadeiras) corresponde a um conjunto de leis que normatizam a comercialização dos alimentos e produtos de puericultura com o objetivo de garantir aos lactentes e crianças o direito à amamentação diretamente no seio materno. Esta norma representa uma importante conquista brasileira no sentido de instituir a proteção às práticas comerciais de propaganda e marketing das indústrias de alimentos, mamadeiras e bicos, bem como reduzir a intensa agressividade imposta pelo mercado na promoção dos seus produtos (SILVA et al., 2008). Os principais instrumentos de lei são: a Lei nº 11.265/2006, alterada pelo Decreto nº 8.552/2015 e a RDC nº 222/2002. A NBCAL obriga que as indústrias coloquem na rotulagem determinadas mensagens que são chamadas de "destaques obrigatórios" e que servem para chamar a atenção do consumidor para os riscos para a saúde das crianças. Por exemplo, o Decreto nº 8.552/2015, 03 de novembro de 2015, que modificou a Lei 11.265/2006 determinou as frases de advertências do Ministério da Saúde. De acordo com esta lei, os rótulos dos alimentos em questão deverão apresentar no lugar da expressão "o Ministério da Saúde adverte", o termo "AVISO IMPORTANTE" (BRASIL, 2015b). Já a RDC nº 222 de 5 de agosto de 2002, está relacionado à promoção comercial e às orientações de uso de FIs Fase 1 e FIs Fase 2, além de outros alimentos voltados para alimentação infantil, fabricados no Brasil e importados (BRASIL, 2002).

As FIs devem conter apenas componentes em quantidades que sirvam a um propósito nutricional ou ofereçam benefícios adicionais já estabelecidos. A inclusão de componentes desnecessários ou quantidades desnecessárias de componentes, pode sobrecarregar as funções metabólicas e outras funções fisiológicas da criança (KOLETZKO et al., 2005). Assim, para que se forneça produtos seguros e nutricionalmente adequados que atendam aos requisitos nutricionais de bebês saudáveis, valores mínimos e máximos de nutrientes nas FIs devem ser respeitados. Deve-se levar também em consideração outros fatores como a biodisponibilidade,

perdas durante o processamento e o prazo de validade, ao se estabelecer os valores mínimos e máximos (KOLETZKO et al., 2005).

A RDC n° 54, de 12 de novembro de 2012, regulamenta a identidade e a qualidade das FIs, dispondo sobre as quantidades ideais para cada nutriente (BRASIL, 2012). De acordo com o Informe Técnico n° 36, de 27 de junho de 2008, da ANVISA, a informação nutricional deve ser declarada por 100 g ou 100 mL do alimento quando exposto à venda. Adicionalmente, pode-se declarar a informação nutricional por 100kcal do alimento pronto para o consumo, mas é opcional (KUS et al., 2011).

De uma forma geral, comparando-se com as recomendações da ESPGHAN, observa-se grande similaridade em relação os valores mínimos e máximos, o que indica uma certa padronização entre produtos nacionais e internacionais. Entretanto, o CODEX que é integrado por membros da FAO e da OMS, que estabelece padrões e diretrizes internacionais na área de alimentos, recomenda que o teor de proteína da FI à base de proteína do LV não ultrapasse 3,0 g/100 kcal, diferentemente da legislação brasileira (RDC n° 44/2011) que permite um teor máximo de 3,5 g/100 kcal para as FIs de seguimento para lactentes à base de proteína do LV não hidrolisada (KOLETZKO et al., 2005; WHO, 2007; BRASIL, 2011).

Além dos requisitos da composição de nutrientes essenciais obrigatórios, que devem estar presentes nas FIs, outros ingredientes com benefícios adicionais podem ser incluídos na formulação com o objetivo de fornecer benefícios semelhantes aos resultados dos lactentes amamentados, como a inclusão de oligossacarídeos como FOS, GOS e inulina que tem como objetivo imitar as funções bioativas dos HMOs presentes no LM (SAAD et al., 2006; MILLANI et al., 2009); e a inclusão de AG essenciais (DHA e ARA), importante para o desenvolvimento de membranas celulares nos olhos, cérebro e tecido nervos (SCHULZKE et al., 2011; QAWASMI et al., 2012; QAWASMI et al., 2013). Embora exista uma tendência atual de adicionar prebióticos, probióticos, ARA e DHA às FIs, mais pesquisas são necessárias para definir recomendações de uso diário e determinar o efeito no desenvolvimento e saúde infantil.

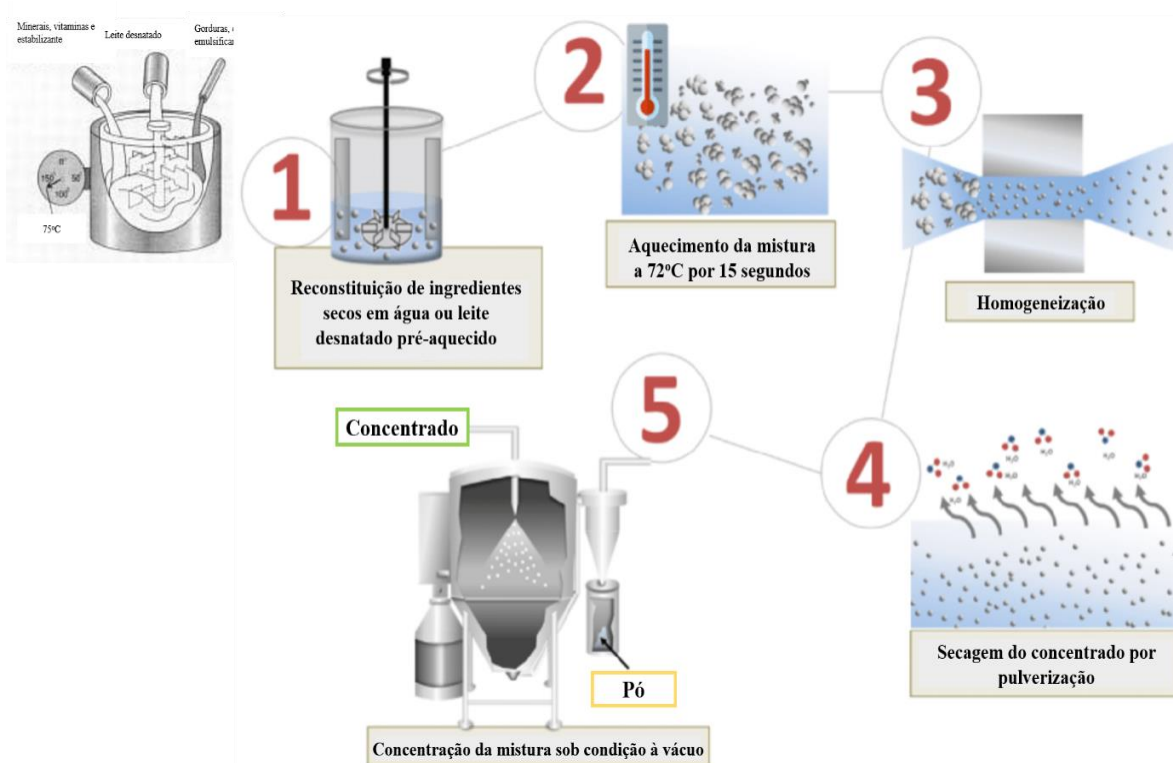
Vale salientar que não existe um padrão de formulação, e cada fabricante pode adaptar, por exemplo, as concentrações, instruções de preparo e tamanho, bem como a indicação de uso, o que torna necessário um acompanhamento da utilização destes produtos por um profissional de saúde (KOLETZKO et al., 2005; CORKINS & SHURLEY, 2016).

1.1.4.1 Tecnologia e produção na elaboração de fórmulas infantis

As FIs são processadas apenas por meios físicos e embaladas de forma a evitar deterioração e contaminação durante seu manuseio, armazenamento e distribuição no país no qual o mesmo é comercializado (CODEX, 2007). Atualmente, em países da Europa e nos Estados Unidos, as FIs são comercializadas em três formas: pó, líquida ou pronta para consumo. No Brasil, somente as duas primeiras opções são regulamentadas. A FI em pó mostrou maior aceitação pelos consumidores devido ao seu menor custo de produção e transporte, aumento do tempo de validade comercial e praticidade.

Desde a década de 1940 os avanços nas técnicas de processamento como homogeneização, mistura de fluidos, dosagem e envase, melhoraram muito a maneira como são elaboradas as FIs. As primeiras FIs desidratadas foram produzidas usando um processo de mistura a seco no qual os ingredientes em pó foram comprados separadamente e misturados em grandes lotes. No entanto, a segurança microbiológica desse processo foi posta em dúvidas, devido à ocorrência de casos de contaminação com patógenos como *Enterobacter sakazakii* e *Salmonella entérica*. Desta forma, sua produção foi substituída por um processo de mistura úmida, como mostrado na Figura 6. Atualmente, a fabricação das FIs envolve um processo de mistura úmida dos ingredientes, no qual os ingredientes secos são dissolvidos em água pré-aquecida ou em leite desnatado por pasteurização e homogeneização. Depois da pasteurização, pode-se optar por preparar um produto líquido ou seco. No primeiro caso, o leite passa por processamento UHT, seguido de embalagens assépticas. Ao preparar fórmulas em pó, o leite é primeiramente concentrado em um evaporador a vácuo, a fim de reduzir os custos de energia associados à secagem por pulverização. A etapa de pulverização é caracterizada pela atomização do líquido em pequenas gotículas cujas moléculas de água são evaporadas por um fluxo de ar aquecido. A temperatura da corrente de ar quente varia entre 140 e 200°C, no entanto, devido ao breve tempo de exposição das partículas ao aquecimento, seu núcleo a temperatura não passa de 45°C. Após passar por um ciclone, o pó resultante é coletado e embalado em sacos grandes ou armazenado em silos. Posteriormente, é enlatado em embalagens de alumínio, em uma linha de embalagem asséptica em atmosfera modificada, para evitar possível oxidação do produto (WALSTRA et al., 2006; GUO, 2014).

Figura 6 - Fluxograma da produção de fórmulas infantis em pó



Fonte: Adaptado de Nunes et al. (2019)

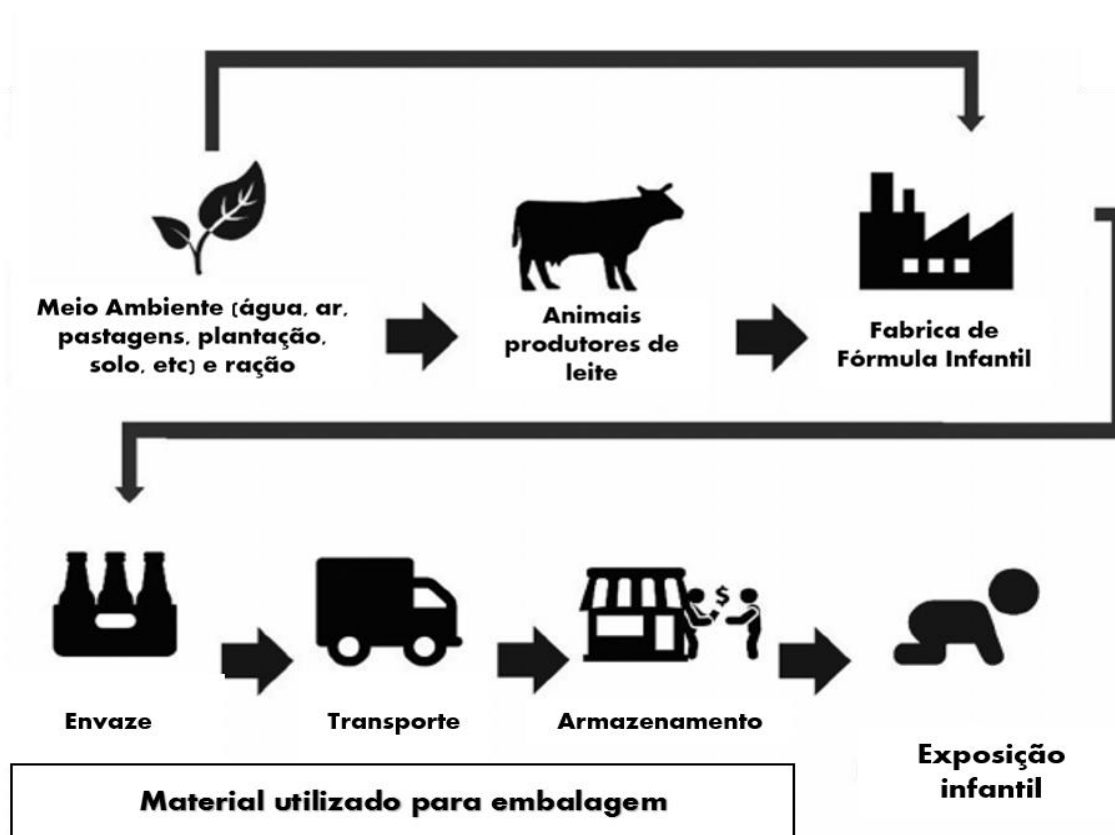
1.1.5 Metais potencialmente tóxicos e seu potencial risco à saúde do lactente

Além dos minerais essenciais, o leite e seus subprodutos, como as FIs, podem conter elementos que em geral são metais em diferentes formas químicas orgânicas, inorgânicas ou elementares, os quais não possuem nenhuma função fisiológica benéfica ou essencial ao organismo. Metais como mercúrio (Hg), cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênio (As), alumínio (Al) e estanho (Sn) são contaminantes tóxicos que produzem efeitos adversos mesmo em baixas concentrações, podendo se acumular no organismo (não sendo metabolizados nem excretados pelo corpo) (DURUIBE et al., 2007; BAIRD, 2011; PERELLÓ et al., 2014). A presença desses contaminantes no alimento podem causar danos às funções orgânicas dos seres humanos, sendo ainda mais preocupante em populações vulneráveis como lactentes, cujo impacto pode afetar de maneira irreversível o desenvolvimento físico e cognitivo (ROCHA et al., 2021).

Esses elementos não fazem parte da composição do leite, mas podem surgir durante alguma etapa do seu processamento ou através do meio ambiente em que estão relacionados (CODEX, 2020). Como ilustrado na figura 7, a contaminação do leite ou de seus subprodutos podem ocorrer durante as várias etapas do processo de fabricação, de forma intencional, como

é o caso dos aditivos alimentares adicionados para fins tecnológicos ou de forma não intencional, devido à possível contaminação da matéria-prima através da ingestão de alimentos e água contaminados por animais produtores de leite, ou até mesmo transferido da embalagem do produto acabado (AKHTAR et al., 2015; CRUZ et al., 2019; PEREIRA et al., 2020). Além disso, a água potável utilizada no preparo das FIs em pó pode aumentar significativamente as concentrações nos produtos prontos, já que há uma possibilidade da contaminação ser oriunda desta água (LJUNG et al., 2011).

Figura 7 - Possíveis fontes e vias de contaminação ao longo da cadeia de produção das fórmulas infantis



Fonte: Adaptado de PEREIRA et al. (2020).

Os metais potencialmente tóxicos como os metais Hg, Cd, Pb, As, Al e Sn, podem prejudicar irreversivelmente o desenvolvimento infantil (CARIGNAN et al., 2015; CHOI et al., 2017). Como a infância é caracterizada por altas taxas de crescimento e desenvolvimento, os bebês são mais suscetíveis a contaminantes químicos nocivos devido à sua fisiologia (maior absorção intestinal quando comparado aos adultos), toxicocinética e proporção de peso corporal.

O Hg é altamente tóxico para crianças e adultos, mas as crianças são mais vulneráveis aos efeitos tóxicos e a exposição a esse elemento, pois podem comprometer seu desenvolvimento (FAIRBROTHER et al., 2007). A toxicidade do Hg depende de sua forma química. Nas crianças, o Hg inorgânico está principalmente associado a danos renais, mas o metilmercúrio atravessa a placenta e as barreiras hematoencefálicas para causar danos neuronais irreversíveis no feto e crianças em crescimento (BOSE-O'REILLY et al., 2010). A presença de Hg no meio ambiente deve-se principalmente à atividade antropogênica e as principais fontes de exposição humana são o meio ambiente (processos industriais) e a dieta alimentar. De forma geral, a exposição ao Hg em níveis variados pode causar danos ao sistema neurológico, cardiovascular, imunológico e respiratório, função renal, pele e fígado (WHO, 2010). Os limites superiores das estimativas da exposição média da dieta ao Hg total em alimentos, que não sejam peixes e crustáceos para crianças, foi estabelecido em 4 µg/kg de peso corporal/semana pela Joint Food and Agricultural Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA).

O Cd é um elemento que se encontra distribuído amplamente no meio ambiente como resultado de processos antropogênicos (WELZ et al., 1999). É classificado como um carcinógeno humano pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, podendo causar câncer de pulmão e próstata. A exposição limitada ao Cd pode causar diarreia, irritação do estômago, enquanto a exposição a longo prazo causa danos aos rins e pulmões (MATA et al. 1995). O Cd está presente no solo, e entra no sistema alimentar por meio das atividades humanas como mineração, tabagismo, uso de combustível fóssil, uso de materiais que contenham Cd, fabricação de fertilizantes fosfatados, resíduos elétricos e eletrônicos e fundição e refino de metais não ferrosos (WHO, 2019a). Desta forma, a exposição ao Cd se dá principalmente através do consumo de alimentos contaminados.

O Pb é um metal potencialmente tóxico que se acumula no organismo e afeta todos os órgãos. Os mecanismos de toxicidade envolvem processos bioquímicos fundamentais, que incluem a habilidade do Pb de inibir a ação do Ca e de interagir com proteínas (MOREIRA et al., 2004). As crianças e lactentes são os subgrupos mais sensíveis aos efeitos neurotóxicos do Pb, e estes danos neurológicos podem vir a ser irreversíveis por serem muito mais suscetíveis aos efeitos neurotóxicos desse elemento do que os adultos (SBP, 2021). Água e alimentos são algumas das fontes de exposição humana ao Pb (WHO, 2019a). A ocorrência de Pb no meio ambiente se dá principalmente pelas atividades antropogênicas tais como queima de combustíveis fósseis, mineração e outros processos de fabricação (MOREIRA et al., 2004).

O acúmulo de metais tóxicos como C de Pb em animais ruminantes, principalmente vacas, búfalos e cabras, é proveniente principalmente da forragem, que cresce em solo contaminado. Esse acúmulo não só tem efeito nocivo ao gado, mas também na população que está consumindo leite e carne contaminados (MATA et al. 1995).

O uso de As na agricultura tem levado a grave contaminação do solo, constituindo riscos imediatos para a saúde humana devido à contaminação de poeira, partículas de solo ou água. A exposição humana ao As pode ocorrer por meio do consumo de água ou de alimentos contaminados, sendo os produtos lácteos uma das fontes de ingestão de As na dieta (WHO, 2019c; AHMED et al., 2016). O As pode ser encontrado em duas formas, o As orgânico e o As inorgânico. A forma inorgânica é a mais nociva ao homem, sendo considerada carcinogênica (KAPAJ et al., 2006; PASIAS et al., 2013). A classificação do As como carcinógeno humano se correlaciona com os cânceres de pele, pulmão, bexiga, rim e fígado e é capaz de influenciar os sistemas neurológico, respiratório, cardiovascular, imunológico e endócrino.

As crianças também são amplamente vulneráveis à exposição ao Al por causa de seus sistemas renais imaturos e exibem uma tolerância estreita a esse metal (AHMED et al., 2016). A agência de proteção ambiental, conhecida como EPA não derivou uma dose de referência (RfD) para alumínio, mas derivou um RfD para fosforeto de alumínio de 0,4 µg/kg/dia com base em um NOAEL (nível sem efeitos adversos observáveis de uma toxina) de 0,51 mg/kg de alimento ou 25 µg/kg/dia (fosfina) convertido em 43 µg/kg/dia de fosfeto de alumínio para peso corporal e parâmetros clínicos observados em ratos durante um estudo oral crônico (EPA, 2008). O Al é um elemento amplamente distribuído na crosta terrestre e por muito tempo foi considerado seguro para os humanos devido à sua biodisponibilidade relativamente baixa. Entretanto, o Al biologicamente disponível não é essencial e pode produzir efeitos tóxicos (FANNI et al., 2014; EXLEY, 2016). A exposição crônica ao Al na dieta, especialmente em indivíduos suscetíveis com função renal prejudicada, frequentemente leva a efeitos adversos neurológicos, esqueléticos, hematopoiéticos, imunológicos e outros efeitos à saúde (BONDY, 2016). O Al pode estar presente no LM e também nas FIs. As concentrações de Al nas FIs são 10 a 40 vezes maiores do que no LM, principalmente nas fórmulas à base de soja (FANNI et al., 2014). A contaminação da FI pode ser devido ao uso de materiais à base de alumínio para embalagem ou contaminação de ingredientes individuais (CHUCHU et al., 2013; FANNI et al., 2014).

Comitês específicos do CODEX são responsáveis por determinar as diretrizes que regulamentam os limites máximos para os metais potencialmente tóxicos. Como muitos deles

estão presentes naturalmente no ambiente, não é possível estabelecer um limite igual a zero, por isso muitas vezes sua presença nos alimentos não significa que foi intencional (CODEX ALIMENTARIUS, 2012). Diante disso, especialistas trabalham com o estabelecimento de níveis bem reduzidos, toleráveis e seguros.

Na tabela 7 estão descritos os limites máximos toleráveis (LMT) dos contaminantes As inorgânico, Cd total, Pb total e Sn inorgânico em alimentos infantis, estabelecidos pela RDC n° 88/2021 em relação às FIs (BRASIL, 2021), bem como as doses de referência (RfD) utilizadas no uso da avaliação de risco à saúde definidas por diferentes entidades públicas (EPA, 2000; FAO, 2003; EPA, 2005; JECFA, 2011; EPA, 2016). Nota-se que na RDC n° 487/2021 não há uma definição para o limite máximo de Hg, Al e U para nenhum produto de origem láctea. No entanto, uma legislação cada vez mais rigorosa vem sendo discutida afim de regulamentar os parâmetros e limites de segurança de metais tóxicos em produtos lácteos, assim como para produtos desenvolvidos para lactentes, uma vez que o conhecimento é limitado para esta classe de alimentos, e faltam dados sobre o limite máximo tolerado para alguns desses metais. Além disso, se levarmos em consideração a frequência de exposição a essas substâncias a um determinado período, e a frequência de seu consumo, os danos podem ser ainda mais sérios (WHO, 2009; POITEVIN, 2016).

Tabela 7 - Limites máximos tolerados (LMT) dos contaminantes arsênio, cádmio, chumbo e estanho em alimentos infantis e dose oral de referência (RfD) para os metais tóxicos definidos por diferentes entidades públicas

Metais	LMT (IN n° 88/2021)		RfD
	FIs Fase 1	FIs Fase 2	
Arsênio	0,02 mg/kg		2,1 µg/kg de peso corporal/dia ⁽⁴⁾
Cádmio	0,01 mg/kg		1 µg/kg de peso corporal/dia ⁽⁵⁾
Chumbo	0,01 mg/kg		1,5 µg/kg de peso corporal/dia ⁽⁵⁾
Estanho*	50 mg/kg		0,3 µg/kg de peso corporal/dia ⁽³⁾
Alumínio	n.d		5 µg/kg de peso corporal/dia ⁽²⁾
Mercúrio	n.d		4 µg/kg de peso corporal/dia ⁽¹⁾
Urânio	n.d.		0,3 µg/kg de peso corporal/dia ⁽³⁾

Fonte: (EPA, 2000⁽¹⁾; FAO, 2003⁽²⁾; EPA, 2005⁽³⁾; JECFA, 2011⁽⁴⁾; EPA, 2016⁽⁵⁾; BRASIL, 2021).

Nota: n.d. (não definido). LMT (limites máximos tolerados). *Alimentos infantis enlatados.

1.1.6 Avaliação da qualidade proteica em alimentos

A avaliação da qualidade proteica dos alimentos é importante quando se deseja considerar os benefícios nutricionais que ela pode fornecer ao lactente. Logo, além do aspecto quantitativo, deve-se levar em conta o aspecto qualitativo, isto é, o valor nutritivo de uma proteína, que dependerá de sua capacidade de suprir as necessidades de nitrogênio, da composição de aminoácidos, e da sua disponibilidade e quantidades adequadas de aminoácidos essenciais, no qual dependerá da digestibilidade das proteínas pelas enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal, além da ausência de toxicidade e/ou propriedade antinutricionais (BLANCO & BRESSANI, 1991; FAO/WHO/UNU, 2007).

Existem diferentes métodos químicos e biológicos para determinar a qualidade de uma proteína. Os métodos químicos determinam a composição de aminoácidos e permitem certas correlações como a determinação do aminoácido limitante por meio do escore químico de aminoácidos (AAS) e através do cálculo do escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS, *Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*) (BLOCK & MITCHELL, 1946; MILLWARD et al., 2008; SCHAAFSMA et al., 2012). Os métodos biológicos utilizados para determinar o valor nutricional de uma proteína baseiam-se na resposta de um organismo à ingestão da proteína estudada (FAGUNDES et al., 2019). Os índices biológicos mais comumente usados são a relação de eficiência proteica (PER, *Protein Efficiency Ratio*), razão proteica líquida (NPR, *Net Protein Ratio*), utilização proteica líquida (NPU, *Net Protein Utilization*), a digestibilidade (PD, *Protein Digestibility*) e o balanço de nitrogênio aparente (BNap, *Apparent Nitrogen Balance*).

O AAS estabelece uma comparação entre o teor de cada aminoácido essencial presente em uma fonte de proteína e compara os valores com uma proteína tida como referência. Para estimativas das necessidades dos lactentes, supõem-se que o LM de uma mãe saudável e bem nutrida durante os primeiros 6 meses de vida, seja considerado uma fonte de ingestão ideal (WHO, 2007). O AAS é uma técnica química considerada rápida, consistente e sem custo. O valor obtido desta comparação é corrigido pela digestibilidade proteica, obtendo então, PDCAAS. O PDCAAS é definido como a relação entre o conteúdo do primeiro aminoácido limitante na proteína (mg de aminoácido por g de proteína) e o conteúdo daquele aminoácido em uma proteína de referência (mg de aminoácido por g de proteína), multiplicado pela digestibilidade. Assim, a qualidade da proteína avaliada pelo escore químico é baseada no aminoácido essencial limitante, no qual valores maiores que 1,0 ou maiores que 100% tanto

para o AAS como para o PCDAAS indicam que a proteína é de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades para a dieta de humanos. O padrão de referência mais utilizado era o padrão de referência da WHO (1985), no entanto as questões relacionadas às necessidades de proteína de bebês foram amplamente revisadas e tiveram sua última atualização em 2007 (WHO, 2007).

O PER determina a eficácia de uma proteína por meio do ganho de peso em gramas pela quantidade de proteína ingerida também em gramas (método *in vivo*). Esta técnica requer alimentar ratos com uma proteína teste e então medir o ganho de peso em gramas por grama de proteína consumida. O valor calculado é então comparado a um valor padrão. Qualquer valor que exceda o valor padrão é considerado uma excelente fonte de proteína. No entanto, este cálculo fornece uma medida de crescimento em ratos e não fornece uma correlação forte com as necessidades de crescimento em humanos. O NPR é uma modificação do PER e consiste em somar o ganho de peso do grupo que recebeu a dieta proteica, com a perda de peso de um grupo equivalente que recebeu a uma dieta aprroteica. A vantagem desse índice sobre o PER consiste em eliminar a variabilidade dos valores do PER em resposta a diferentes concentrações de proteína na dieta. Já o NPU é a razão entre a massa de aminoácidos convertida em proteínas e a massa de aminoácidos fornecida. Esse valor pode ser afetado tanto pela recuperação de aminoácidos essenciais do organismo, quanto pelo teor do aminoácido limitante no alimento.

A digestibilidade mede a qualidade da proteína calculando o quanto de nitrogênio esta biodisponível para sua efetiva absorção (bioacessibilidade) ou quanto deste nitrogênio foi absorvido e está disponível para uso das funções fisiológicas do organismo (biodisponibilidade) (RUTHERFURD et al., 2012). O valor calculado é multiplicado por 100 e expresso como uma porcentagem do nitrogênio disponível ou utilizado. A digestibilidade fornece uma medida de quão eficiente o corpo pode utilizar a proteína consumida na dieta. Quando certas ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes ou transformada em produtos do metabolismo pelos microrganismos do intestino grosso (SGARBIERI, 1996; COZZOLINO et al., 2005; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2009).

Estudos de bioacessibilidade e de biodisponibilidade podem ser feitos tanto com experimentos *in vitro* quanto com experimentos *in vivo*. Experimentos *in vivo* são geralmente feitos utilizando animais com metabolismo próximo ao do ser humano, mas este método é geralmente mais caro, laborioso e apresenta limitações, tanto éticas quanto experimentais, pois apesar do animal ter o metabolismo próximo ao do ser humano, mesmo assim, pode apresentar grandes diferenças, uma vez que cada espécie apresenta fatores fisiológicos intrínsecos. Nos

experimentos *in vivo* o teor biodisponível do elemento de interesse é estimado subtraindo-se a quantidade desse elemento excretado pelo animal da quantidade ingerida (técnica do balanço de massa). Por outro lado, experimentos *in vitro* são feitos visando a simulação das condições fisiológicas, bem como a sequência de eventos que ocorrem durante a digestão no trato gastrointestinal. Fatores importantes como temperatura, movimentos peristálticos e a composição química e enzimática da saliva, do suco gástrico, do suco duodenal e do suco biliar devem ser reproduzidos de forma que os resultados possam refletir as condições reais do indivíduo. Entretanto, os estudos *in vitro* possuem vantagens como o menor custo e ser menos laboriosos, mas também apresentam algumas limitações éticas, caso seja necessário o uso de saliva humana para simular a fase oral.

1.2 Justificativa

As FIs são importantes substitutos do LM quando não é viável o aleitamento. As principais fórmulas comercializadas têm como matéria-prima básica o LV, no entanto, o consumo direto deste é considerado impróprio para lactentes menores de um ano devido à diferença de composição do LV frente ao LM. Portanto, modificações tecnológicas na composição do LV são necessárias para atender às necessidades nutricionais de cada faixa etária. Nos últimos trinta anos, as composições das FIs foram sendo aprimoradas, não apenas para aumentar a semelhança nutricional com o LM, visando atender às diferentes exigências fisiológicas ou patológicas do lactente, mas também com o objetivo de incluir componentes com benefícios adicionais à saúde infantil. Entretanto, apesar das melhorias, ensaios clínicos continuam observando disparidades no crescimento, no neurodesenvolvimento, na composição do microbiota, na função imune e na incidência de doenças infecciosas entre lactentes alimentados com LM frente aqueles que recebem FIs.

A alimentação saudável e adequada estabelecida na infância, principalmente nos dois primeiros anos de vida, são determinantes para um crescimento e desenvolvimento ideal, bem como pode prevenir problemas de saúde a curto e longo prazo. Embora todos os nutrientes sejam essenciais, as proteínas, especialmente, tem um importante papel nesta fase da vida. Não menos importante, um suporte adequado de minerais permite a prevenção de doenças, auxilia no crescimento celular, formação de tecidos, reparos e toda a orquestra metabólica que envolve o crescimento e desenvolvimento. A carência de minerais pode ser irreversível se não atendida na infância, o que pode impactar no decorrer da vida adulta. Além disso, os produtos acabados

processados não devem conter quaisquer metais potencialmente tóxicos em quantidades que possam levar a efeitos negativos para a saúde.

Considerando que na maioria das vezes as FIs são a única fonte de alimento oferecida ao lactente, e que as necessidades nutricionais da dieta durante a fase inicial da criança são as mais elevadas, e que inadequação na composição de nutrientes podem impactar negativamente à saúde do lactente, é de extrema importância verificar a qualidade nutricional destes produtos. Entretanto, apesar da importância para a saúde pública de se alcançar uma ingestão adequada de nutrientes durante a infância, há uma escassez de estudos científicos avaliando analiticamente a qualidade proteica, bem como o valor biológico das proteínas utilizadas na fabricação de FIs comercializadas no Brasil.

Importantes avanços científicos foram observados em relação à variedade de compostos bioativos presentes no LM e seus benefícios fisiológicos, o que despertou o interesse por parte de profissionais da área de nutrição infantil, bem como de pesquisadores da ciência e tecnologia de alimentos que buscam aprimorar as características nutricionais das FIs. Apesar das importantes descobertas, as atuais diretrizes que avaliam a eficiência nutricional desses novos ingredientes adicionados às FIs não são suficientes para garantir a diversidade encontrada no LM. Logo, uma abordagem mais detalhada é necessária para se ter mais informações a respeito dos benefícios destes novos compostos para a saúde infantil.

As informações contidas nos rótulos são o principal elo de comunicação entre a indústria e o consumidor sobre os nutrientes e a composição do alimento, conferindo a rotulagem um caráter de promoção à saúde. O acesso a informações corretas e claras são imprescindíveis para auxiliar o uso correto das FIs, uma vez que o uso inadequado destas formulações pode trazer impactos negativos à criança. Desta forma, é de suma importância que se monitore rotineiramente o cumprimento das medidas estabelecidas pelas legislações vigentes.

Este é um estudo inédito, no qual avaliou-se a qualidade biológica das proteínas, em diferentes FIs comercializadas no Brasil, por meio de metodologias analíticas mais precisas, bem como avaliou-se a segurança destas fórmulas quanto a presença de metais potencialmente tóxicos. Com os dados obtidos neste trabalho será possível contribuir para a atualização do conhecimento científico sobre o tema, com informações que possam de alguma forma, auxiliar técnica e cientificamente os órgãos reguladores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a qualidade nutricional de proteínas e minerais presentes em diferentes marcas de fórmulas infantis para lactentes (0 – 6 meses) e de fórmulas infantis de seguimento para lactentes (6 – 12 meses) comercializadas no estado do Rio de Janeiro, bem como verificar a conformidade dos rótulos frente à legislação vigente, e em paralelo investigar a presença de metais potencialmente tóxicos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o conteúdo proteico e avaliar se estes se encontram dentro dos limites mínimos e máximos recomendados pela legislação brasileira e pelo Codex alimentarius;
- Verificar o perfil proteico e as proporções entre proteínas do soro e as caseínas por eletroforese SDS-PAGE;
- Identificar e quantificar as frações de proteínas identificadas por eletroforese, bem como aquelas proteínas com características bioativas (α -La e Lf) por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD);
- Avaliar através de uma revisão sistemática as evidências científicas relacionadas aos benefícios fisiológicos conferidos pelos compostos bioativos (α -La, Lf, taurina, MFGM, folatos, poliaminas, LC-PUFAs, prebióticos e probióticos) identificados previamente no leite materno e seus efeitos no desenvolvimento e saúde infantil e seu potencial para implementação nas fórmulas infantis;
- Identificar e quantificar os aminoácidos essenciais por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de aerossol carregado (CLAE-CAD);
- Avaliar o valor biológico através do conteúdo de aminoácidos essenciais, da bioacessibilidade proteica por meio da digestibilidade *in vitro* (IVPD%), pelo escore químico de aminoácidos (AAS) e pelo escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS).
- Determinar o conteúdo de minerais essenciais por espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), avaliando se estes se encontram dentro dos limites mínimos e máximos recomendados pela legislação brasileira e pelo Codex alimentarius;

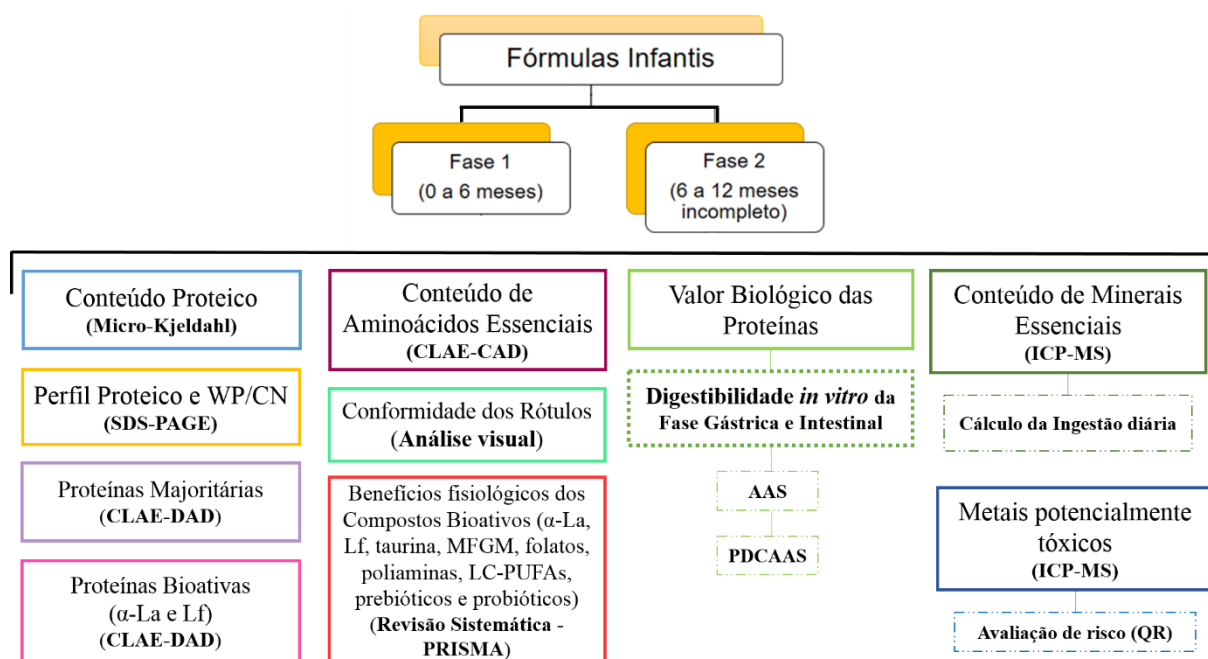
- Verificar a conformidade da rotulagem quanto às recomendações descritas nas RDCs n° 43/2011 e 44/2011 através da análise visual dos rótulos.
- Investigar a presença de metais potencialmente tóxicos por espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e determinar seu potencial risco à saúde infantil através do quociente de risco (QR).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A realização das análises ocorreu em diferentes centros laboratoriais analíticos, dentre eles, no laboratório de controle físico-químico de alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (CLAN/UFF), no laboratório de análises avançadas em bioquímica e biologia molecular do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LAABBM/IQ/UFRJ), no núcleo de análise de alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (NAL/LADETEC/UFRJ), no laboratório de espectrometria atômica na Universidade Católica do Rio de Janeiro (LABSPECTRO/PUC-RIO) e no Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ). Para a realização deste estudo não foi necessária a aquisição de nenhum material permanente ou equipamento, pois todos estes já estavam presentes nos respectivos laboratórios. Quanto ao material de consumo, o mesmo foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Código 311422/2016-0 e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) – Código E-26/203.049/2017.

Este estudo tem caráter exploratório no qual através de métodos analíticos quantitativos e qualitativos foi possível avaliar a qualidade nutricional de proteínas, aminoácidos, minerais e investigar a contaminação por metais potencialmente tóxicos. Com um ensaio *in vitro* foi possível determinar o valor biológico das proteínas e através de um estudo observacional foram analisadas as informações presentes nos rótulos. Como parâmetro principal foram considerados os limites máximos e mínimos legalmente exigidos nas resoluções RDC 43/2011, RDC 44/2011 e pelo Codex Alimentarius, assim como foram utilizados valores de referência em que levou-se em consideração as faixas etárias dos consumidores de FIs. A figura 8 representa o desenho experimental com todas as análises que foram realizadas no presente estudo.

Figura 8 - Desenho experimental com as metodologias utilizadas para cada análise



Nota: SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio), CLAE-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos), CLAE-CAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de aerossol carregado), ICP-MS (espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado), α-La (α-Lactoalbumina), Lf (lactoferrina), MFGM (membrana do glóbulo gordo de leite), LC-PUFAs (ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa), AAS (escore químico de aminoácidos), PDCAAS (escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica), QR (quociente de risco)

3.1 Seleção das amostras

Foram selecionadas as principais marcas disponíveis em diferentes estabelecimentos comerciais no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Todos os produtos estavam registrados na ANVISA e estavam acondicionados em latas de alumínio, rotulados de acordo com o fabricante, e na forma em pó. Em relação à composição das fórmulas, foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: (1) todas as FIs analisadas são compostas essencialmente à base de leite de vaca; (2) proteínas do leite de vaca não hidrolisadas (3) a lactose é o carboidrato principal; e (4) são suplementadas com DHA e ARA. As FIs adicionadas de outras fontes de proteína que não a do LV, como proteína da soja ou do trigo e FIs projetadas para necessidades específicas, como sem lactose ou hidrolisada, não foram incluídas neste estudo. Considerando os produtos comercializados no estado do Rio de Janeiro que atendem aos critérios de inclusão, foram avaliadas dez formulações produzidas por três fabricantes diferentes. Dentre esses

fabricantes, foram selecionadas cinco marcas de fórmulas para crianças de 0 a 6 meses (Fase 1) e cinco marcas de fórmulas para crianças de 6 a 12 meses incompletos (Fase 2), sendo obtidos três lotes de cada marca, totalizando trinta amostras. Os nomes dos fabricantes e marcas não foram divulgados por questões éticas e as amostras foram identificadas por códigos (Tabela 8).

Tabela 8 - Código das fórmulas infantis e seus lotes

Marca	Fase 1	Lotes	Fase 2	Lotes
ME	0 - 6	ME1A	6 - 12	ME2A
		ME1B		ME2B
		ME1C		ME2C
NC	0 - 6	NC1A	6 - 12	NC2A
		NC1B		NC2B
		NC1C		NC2C
NN	0 - 6	NN1A	6 - 12	NN2A
		NN1B		NN2B
		NN1C		NN2C
DM	0 - 6	DM1A	6 - 12	DM2A
		DM1B		DM2B
		DM1C		DM2C
DA	0 - 6	DA1A	6 - 12	DA2A
		DA1B		DA2B
		DA1C		DA2C

3.2 Conteúdo total de proteínas

O conteúdo total de proteínas foi avaliado pelo método de micro-Kjeldahl, baseando-se na metodologia proposta pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012). Essa análise é baseada na determinação do teor de nitrogênio proteico e não proteico, em que após o cálculo de conversão do nitrogênio em proteínas, utilizando-se um fator de conversão específica para cada alimento, obtém-se o conteúdo de proteína.

Utilizou-se como materiais para esta análise uma balança analítica, um bloco digestor, e um destilador micro-Kjeldahl, assim como tubo de Kjeldahl de 300 mL, becker de 100 mL, pipeta graduada de 1 mL, pipeta volumétrica de 10 mL e um balão volumétrico de 50 mL. E como reagentes: mistura catalítica (sulfato de potássio e sulfato de cobre), ácido sulfúrico concentrado, solução de ácido bórico a 4%, indicador de Tashiro, hidróxido de sódio a 40%, e solução de ácido clorídrico 37% PA a 0,1 mol/L. De forma geral, este método compreende quatro etapas: digestão da amostra, destilação, titulação e cálculo para obtenção do conteúdo de proteína.

3.2.1 Digestão da amostra

Nesta primeira etapa, foi pesado em uma balança analítica 0,5 g da amostra em papel manteiga (livre de nitrogênio), anotando-se este valor para que ele seja contabilizado no cálculo final. Essa amostra foi transferida para um tubo de Kjeldahl próprio para digestão, adicionando a seguir 2 g de mistura catalítica e 8 mL de ácido sulfúrico concentrado. Este tubo foi levado ao bloco digestor em que foi aquecido, a princípio lentamente e depois fortemente até vapores brancos. Ajustes de temperatura no digestor para a realização da digestão: 150°C = 1h; 200°C = 0,5 h; 300°C = 0,5 h; 400°C = 1,5 h.

Ao observar que o líquido estava límpido, foi deixado por mais de 30 minutos em aquecimento. Posteriormente, o aquecimento foi interrompido, aguardando por 24 horas este líquido esfriar para passar para a segunda etapa.

3.2.2 Destilação da amostra

O conteúdo do tubo foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL com água destilada, homogeneizado e levado ao refrigerador para esfriar. A seguir foram aliquoteado 10 mL do digerido no balão volumétrico e colocado no receptor do destilador. Em seguida, foi adicionado uma alíquota de 7 mL de hidróxido de sódio a 40%. Após este procedimento, foi colocado um béquer com um preparado de 20 mL de ácido bórico a 4%, 8 gotas de indicador de Tashiro e o béquer com a mistura foi colocado abaixo do condensador, encostando a ponta do condensador no líquido do béquer para que não haja nenhuma perda de nitrogênio. Após obter 80 mL de volume de destilado no béquer, o mesmo foi levado para titulação.

3.2.3 Titulação

O destilado foi titulado com solução de ácido clorídrico a 0,1 mol/L. A solução que inicialmente era verde tornou-se azul quando toda amônia foi neutralizada pela solução de ácido clorídrico.

3.2.4 Cálculo para obtenção do teor de proteína

Para o cálculo de conversão do nitrogênio em proteínas, utilizou-se a equação 1 no qual foi empregado o mesmo valor de conversão utilizado para LM (6,25).

$$\text{Conteúdo de proteína} = \frac{\text{Vol.} \times \text{Fc} \times 50 \times \text{K} \times 14 \times \text{N} \times 100}{\text{Peso da A (mg)} \times \text{alíquota da amostra}} \quad (\text{Equação 1})$$

Vol. = volume de ácido clorídrico (HCl) que será gasto na titulação;

Fc = fator de correção do HCl (0,1 mol/L);

50 = volume do balão volumétrico utilizado;

K = 6,25 (fator de proteína em mistura);

14 = peso molecular do nitrogênio;

N = massa da proteína (peso anotado inicialmente).

3.3 Perfil proteico

Para análise do perfil proteico foi utilizada a eletroforese em mini géis com diferentes concentrações de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes pela ação de dodecilsulfato de sódio (SDS) segundo a técnica de Laemmli (1970). A partir do SDS-PAGE, foi possível identificar e quantificar as principais proteínas presentes nas FIs elaboradas a partir do LV. Ademais, foi estimada a abundância relativa através da intensidade da coloração de cada fração, determinando desta forma, as proporções entre as proteínas solúveis no soro e caseínas (proteínas insolúveis). Cada gel representava os três lotes das FIs de fase 1 e as FIs de fase 2 de uma mesma marca. Ao todo as amostras foram aplicadas em triplicata com três repetições de cada gel.

A determinação das frações proteicas por eletroforese seguiu as etapas a seguir: preparo das amostras, concentração aproximada de proteína total nas amostras, preparo dos géis, aplicação das amostras, corrida eletroforética, coloração e descoloração dos géis (= revelação), conservação em água destilada, foto-documentação e posterior análise da intensidade das bandas.

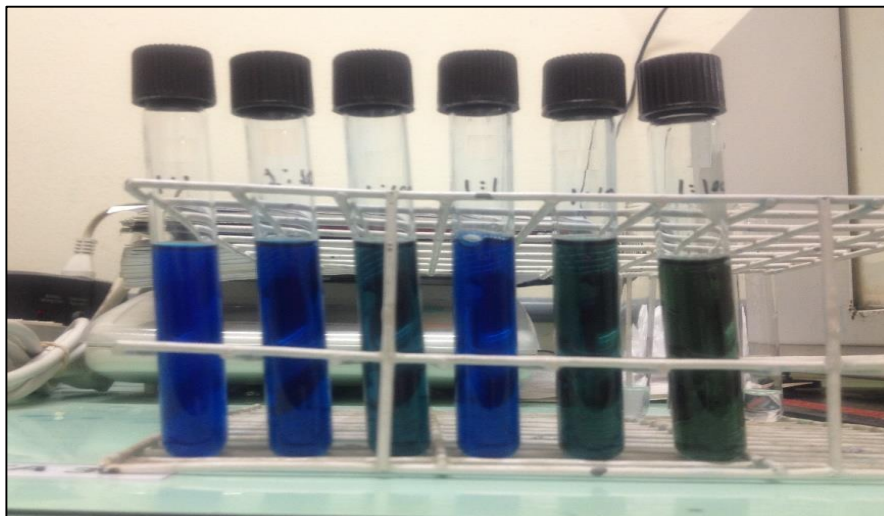
3.3.1 Preparo das amostras para análise pelo método SDS-PAGE

As amostras foram preparadas de acordo com o método descrito por Almeida et al. (2015b) com pequenas modificações. Primeiramente, o pó foi ressuspensão com água destilada, respeitando as recomendações descritas no rótulo de cada produto. O preparado foi transferido para um tubo falcon de 50 mL e centrifugado por 30 min à 3500 rpm, e levado ao refrigerador por 15 min para facilitar a retirada da gordura superficial. Após a retirada da gordura, foram adicionados 400 µL de solução tampão (8 mol/L Ureia + 2 mol/L Tiureia) + 10 µL de DTT (Ditiotreitol + 1mL água MilliQ®). Esta etapa visa desnaturar e romper as ligações dissulfetos. A seguir a concentração aproximada das proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (1976).

3.3.2 Concentração aproximada de proteína nas amostras

A concentração aproximada das proteínas nas amostras foi estimada pelo método de Bradford (1976), que é baseado na interação entre o corante Coomassie Blue G-250® e macromoléculas de proteínas. A proteína foi quantificada diluindo as amostras em solução corante de Coomassie Blue G-250® em três proporções (1:1, 1:10 e 1:100, v/v) (Figura 9) e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu®, KYO, JPN) utilizando comprimentos de onda de 595 e 450 nm (BRADFORD, 1976; ZOR & SELLINGER, 1996). Os resultados foram calculados pela diferença entre a absorvância em cada comprimento de onda. Este método reduz a possibilidade de erro ao ler o corante que não se ligou às proteínas. Após determinar qual foi a melhor diluição, as amostras foram diluídas em solução corante (4% SDS, 0,5 mol/L Tris-HCl (pH 6,8), 0,05 mol/L DTT, 20% glicerol e uma pitada de azul de bromofenol), antes de serem aplicadas no gel.

Figura 9 - Etapa de diluição para estimar a concentração das proteínas nas amostras por espectrofotômetro

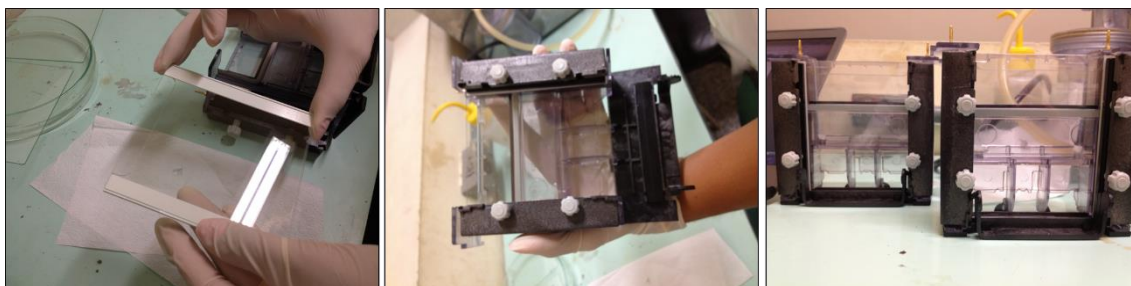


Fonte: (Arquivo pessoal).

3.3.3 Preparo dos géis

Placas de vidro foram montadas formando um sanduíche, separadas por espaçadores, fixadas com prendedores e encaixadas no suporte de uma cuba de modo a evitar vazamento do tampão de corrida (Figura 10). Cada um dos géis foi preparado separadamente respeitando a sequência de adição entre as placas. Procedeu-se à preparação de um gel de cada vez.

Figura 10 - Etapas da montagem da cuba menor



Fonte: (Arquivo pessoal)

O gel de separação foi preparado na concentração de 12% e o gel de empilhamento na concentração de 4% a partir da solução acrilamida/bisacrilamida (40% Acrylamide/Bis Solution, BioRad®) em tampão Tris-HCl; SDS 10%, Tetrametiletenodiamina (TEMED) e Persulfato de amônio 10% e água destilada conforme tabela 9 a seguir:

Tabela 9 - Preparação dos géis de separação e empilhamento

Gel 12% - Gel de separação (para 2 mini géis)	
Água destilada	6,52 mL
Solução Acrilamida/Bis 40%	4,5 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	3,75 mL
SDS 10%	0,15 mL ou 150 µL
TEMED*	7,5 µL
APS 10%*	75 µL
Gel 4% - Gel de empilhamento (para 2 minigéis)	
Água destilada	6,36 mL
Solução Acrilamida/Bis 40%	1 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,52 mL
SDS 10%	0,10 mL ou 100 µL
TEMED*	10 µL
APS 10%*	50 µL

Nota: (*)Deixar para colocar por último, para não polimerizar antes da hora.

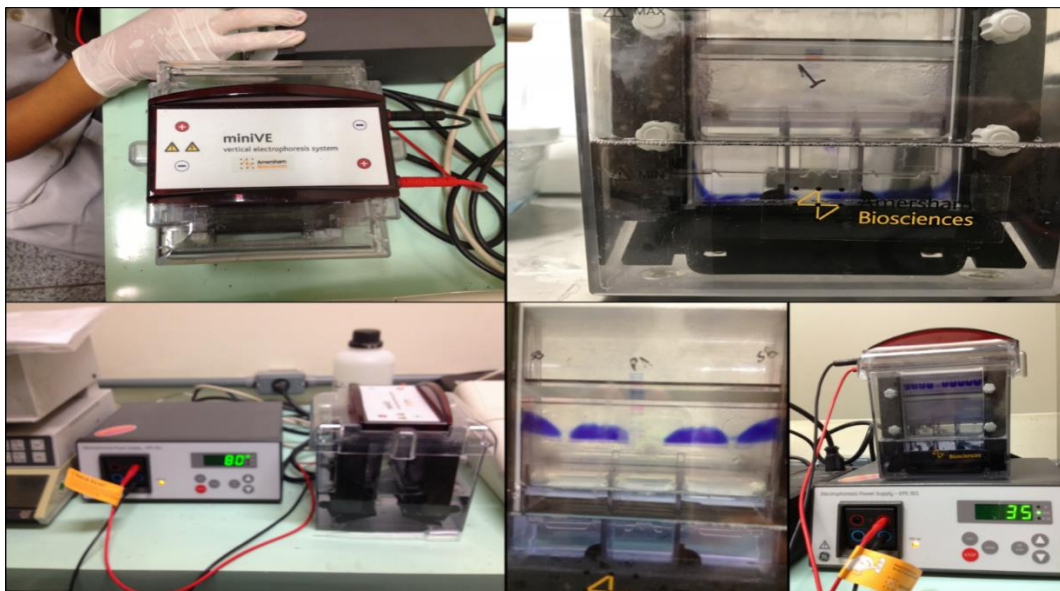
Após preparo do gel de separação, a solução foi vertida lentamente no interior da placa de vidro com o auxílio de uma pipeta até uma altura de 2 a 3 cm da extremidade superior da mesma. Posteriormente, adicionou-se água destilada até total cobertura da superfície do gel para eliminar as bolhas geradas e nivelar o gel. Após completa polimerização do gel de separação, que se dá em torno de 40 min, a água destilada foi dispensada e o espaço livre entre as placas foi seco com papel filtro para posterior adição do gel de empilhamento. A solução do gel de empilhamento foi então vertida até a extremidade superior da placa e logo a seguir o pente que forma os poços para aplicação das amostras foi inserido. Após polimerização do gel de empilhamento, que ocorreu em torno de 15 min, o pente foi retirado, os poços formados foram embebidos com tampão de corrida (25 mmol/L Tris-HCl, 192 mmol/L Glicina e 0,1% SDS pH 8,3) e as amostras aplicadas.

3.3.4 Aplicação das amostras e corrida eletroforética

Foram aplicados 20 µL da amostra (5 mg/mL de proteína) nos poços laterais e 10 µL do padrão de peso moleculares (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad) no poço central do gel. Após aplicação das amostras e padrão nos géis, seguiu-se a montagem do sistema, colocando a cuba menor dentro da cuba maior, as abas na parte inferior da cuba menor foram abertas afim de permitir a passagem da corrente elétrica, e por último antes de encaixar a tampa do conjunto, a cuba maior foi completada com tampão de corrida para a seguir iniciar a corrida eletroforética (Figura 11).

A eletroforese ocorreu a uma voltagem fixada de 200 V e a corrente de 25 mA em tampão de corrida por cerca de 2 horas até a marcação do azul de bromofenol (frente de corrida) atinja aproximadamente 0,5 cm da extremidade inferior do gel.

Figura 11 - Ilustração da corrida eletroforética



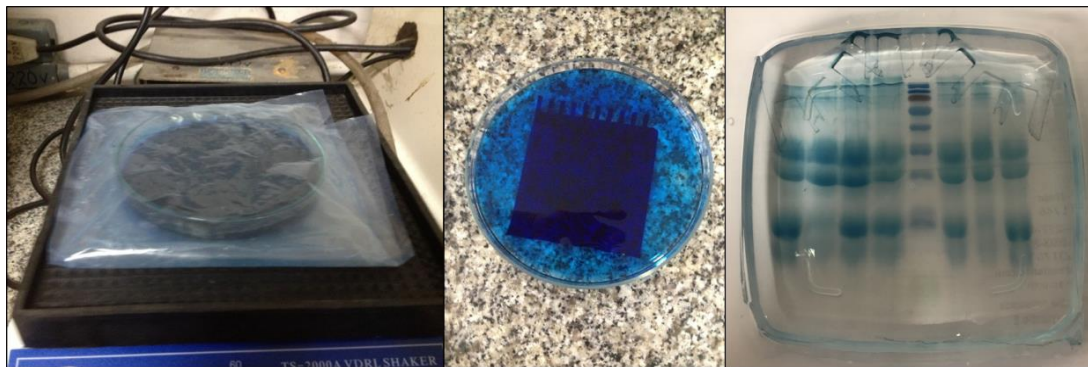
Fonte: (Arquivo pessoal)

Nota: Equipamento: GE, Electrophoresis Power Supply (modelo EPS 3501).

3.3.5 Revelação dos géis

Após o término da corrida eletroforética no equipamento para eletroforese (GE, Electrophoresis Power Supply, modelo EPS 3501) (Figura 12), os géis foram corados com solução de Coomassie Blue G-250 por 24h e então descorados com uma solução de ácido acético, metanol e água destilada (20:20:60, v/v/v) até que as bandas de proteína fossem reveladas (CONTE-JUNIOR et al., 2006).

Figura 12 - Ilustração da revelação do gel



Fonte: (Arquivo pessoal).

3.3.6 Fotodocumentação e análise das imagens

Após revelação dos géis suas imagens foram fotodocumentadas por um *scanner* acoplado ao computador utilizando-se o *software* Gel Doc XR + Gel Documentation System. Em seguida, as mesmas foram analisadas pelo *software* TotalLab Quant[®], a partir do qual determinou-se a intensidade da coloração por densitometria e estimou-se o volume aparente de cada banda de proteína.

Os pesos moleculares das frações de proteínas foram estimados utilizando padrões de massa molecular conhecidos (Precision Plus Protein[™] Standards, Bio-Rad). A partir da posição das bandas no gel foi possível a identificação das proteínas correspondentes.

3.4 Identificação e quantificação das proteínas majoritárias

A partir da eletroforese (SDS-PAGE) foi possível separar e identificar as diferentes frações proteicas presentes nas FIs elaboradas a partir do LV. Entretanto, quando se trata de quantificar individualmente estas frações, a eletroforese não é a melhor técnica. Entre os métodos modernos de análise de compostos, a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação em amostras complexas como o leite, pois esta é uma técnica de alta resolução, eficiência e sensibilidade. Por isto, utilizou-se a CLAE-DAD para separação, identificação e a quantificação das frações de proteínas que tiveram maior destaque na eletroforese, bem como a identificação e quantificação das proteínas com características bioativas.

3.4.1 Preparo dos padrões

A quantificação das proteínas nas amostras analisadas foi realizada por padronização externa. Para isso, foram preparadas soluções estoque individuais de cada padrão e, em seguida, preparou-se uma solução padrão mista, denominadas como mix, contendo as seis frações de proteína de interesse (α -La, β -Lg, κ -CN, α -CN, β -CN e Lf), todos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Os padrões de proteínas foram solubilizados em solvente contendo acetonitrila, água e ácido trifluoroacético (TFA) em uma proporção de 100:900:1 (v/v/v) para obtenção de soluções estoque. Para cada padrão foi preparado uma solução estoque em concentrações variadas: 10,0 mg/mL (α -La), 10,0 mg/mL (β -Lg), 20 mg/mL (κ -CN), 20 mg/mL (α -CN), 10,0 mg/mL (β -CN) e 1,0 mg/mL (Lf). A partir das soluções estoque foram realizadas sucessivas diluições para cada fração de proteína e a seguir foram injetadas no equipamento para construção das curvas de calibrações, que auxiliou na quantificação das frações proteicas. Os padrões, assim como o mix, foram analisados em triplicata.

3.4.2 Preparação das amostras

A extração da proteína seguiu o protocolo proposto por Bobe et al. (1998) com algumas modificações. Antes de iniciar o procedimento de extração, 10 g da amostra foram pesados e diluídos em 100 ml de água MilliQ[®], afim de ressuspender o pó. Após esta etapa, uma alíquota de 500 μ L da amostra ressuspensa foi adicionado 500 μ L de uma solução contendo 0,1 mol/L de tampão BisTris (pH 6,8), 6 mol/L hidrocloreto de guanidina, 5,37 mmol/L citrato de sódio e 19,5 mmol/L ditiotretol (pH 7,0). A amostra foi então agitada por 10 segundos e incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente a amostra foi centrifugada por 20 min a 20.000 g a uma temperatura de 4°C em uma microcentrífuga (Microfuge[®] R, Beckman Coulter[™]). Após centrifugação, a camada de gordura superficial foi removida com a ajuda de uma espátula, e a amostra solubilizada restante foi diluída 1:3 (v/v) com uma solução contendo 4,5 mol/L cloridrato de guanidina e solvente composto por acetonitrila, água destilada e deionizada, e ácido trifluoroacético em uma proporção de 100:900:1 (v/v/v; pH 2,0). Os extratos finais foram armazenados a -20°C até análise cromatográfica. As amostras foram analisadas em triplicata (Figura 13).

Figura 13 - Preparo da amostra para extração das proteínas



Fonte: (Arquivo pessoal).

3.4.3 Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu constituído de uma bomba quaternária (LC-20AD, Shimadzu Corporation, Japão), equipado com uma coluna C18 Kromasil® de fase reversa de 5 μm (250 x 4,6 mm ID, Kromasil®) e um detector UV-VIS (SPD-20A, Shimadzu Corporation, Japão), gerenciado pelo software LabSolutions System (Shimadzu Corporation, Japão).

3.4.4 Condições cromatográficas

Foi utilizado dois métodos cromatográficos, sendo um para κ -CN, α -CN, α -La, β -CN e β -Lg (BONFATTI et al., 2008) e o outro especificamente para a Lf (DRAČKOVÁ et al., 2009). Ambas as condições foram otimizadas para o gradiente e a taxa de fluxo, afim e melhorar a resolução dos picos.

A detecção de κ -CN, α -CN, α -La, β -CN e β -Lg ocorreu no comprimento de onda de 214 nm. A eluição foi realizada a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min usando uma mistura de dois solventes: o solvente A consistia em 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água e o solvente B era 0,1% de TFA em acetonitrila. As separações foram realizadas em gradiente linear de 33 a 35% B em 5 min (0,4% B min), de 35 a 37% B em 4 min (0,5% B min), de 37 a 40% B em 9 min (0,33% B min), de 40 a 41% B em 4 min (0,25% B min), seguido por uma eluição em gradiente a 41% B durante 6 min, de 41 a 43% B em 1 min (4% B min), de 43 a 45% B em 8 min (0,25% B min⁻¹) e retornado à condição inicial em 1 min. Antes de injetar a amostra seguinte, a coluna foi reequilibrada nas condições iniciais por 8 min. O volume de injeção foi

de 20 µl, o tempo total de análise para cada amostra foi de 45 min e a temperatura da coluna foi mantida a 45°C.

A detecção da Lf ocorreu no comprimento de onda de 205 nm. A eluição foi realizada a uma taxa de fluxo de 1 mL/min usando uma mistura de dois solventes (solvente A - 0,1% TFA em água e solvente B - 0,1% de TFA em acetonitrila), similar ao utilizado na metodologia realizada para analisar as outras frações. Nesta corrida, o gradiente foi de 25 a 50% B em 10 min, seguido por uma eluição a 50% B durante 5 min, e retornado à condição inicial em 5 min. A temperatura da coluna foi fixada em 45°C, o volume de injeção foi de 10 µl e o tempo total de análise para cada amostra foi de 21 min.

3.4.5 Determinação de parâmetros para validação dos métodos utilizados

A adaptação ou aplicação de um método analítico envolve um processo de avaliação que ateste a sua eficiência. Na clássica validação de métodos cromatográficos, os parâmetros analíticos normalmente determinados são: seletividade; linearidade; repetibilidade; exatidão; faixa linear; robustez; limite de detecção e limite de quantificação (ARAGAO et al., 2009; BRASIL, 2003a). Entretanto, neste estudo, avaliou-se apenas os seguintes parâmetros: linearidade, repetibilidade, limite de detecção e limite de quantificação.

3.4.5.1 Linearidade e faixa linear

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração dos padrões analisadas. A linearidade do método pode ser determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa da espécie de interesse, geralmente obtida por uma equação da reta $y = ax + b$, chamada de curva analítica. Os coeficientes a e b da curva analítica podem ser estimados a partir de um conjunto de medições experimentais usando o método matemático conhecido como regressão linear (ARAGAO et al., 2009).

Além destes, calcula-se o coeficiente de correlação r ou o coeficiente de determinação r^2 , que são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. De acordo com o critério da RDC 899/2003

da ANVISA, o coeficiente de correlação deve ser como mínimo igual a 0,99 e de acordo com o INMETRO dever ter um valor acima de 0,90 (ANVISA, 2003; INMETRO, 2018).

Para avaliação da linearidade, foram obtidas curvas analíticas para as diferentes concentrações injetadas ($n = 5$ pontos) dos seis padrões de proteínas individuais do LV. Para determinação da faixa linear de trabalho foram obtidas as respostas em mAU (área de pico) para a faixa de concentração entre 1,25 a 20 mg/mL (κ -CN), 0,15 a 2,5 mg/mL (α -CN), 0,15 a 2,5 mg/mL (α -La), 0,15 a 2,5 mg/mL (β -CN), 0,15 a 2,5 mg/mL (β -Lg) e 0,062 a 1,0 mg/mL (Lf). Os gráficos foram construídos a partir das respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes, em escala logarítmica, no eixo x, para os seis padrões individualmente.

3.4.5.2 Repetibilidade

A precisão foi avaliada em relação aos níveis de repetibilidade. Para se avaliar a repetibilidade do método, 6 replicatas de uma das amostras foi analisada sob as mesmas condições.

3.4.5.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados empregando-se o método baseado em parâmetros da curva analítica. O limite de detecção (LOD) foi definido como a concentração mais baixa do analito que poderia ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. Neste método, o limite de detecção (LOD) pode ser expresso como na equação 2.

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot s/a \text{ (Equação 2)}$$

Onde: “s” é a estimativa do desvio padrão da resposta (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e “a” é o coeficiente angular da curva analítica.

Os mesmos critérios de LOD podem ser adotados para o LOQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LOQ pode ser calculado a partir da equação 3.

$$\text{LOQ} = 10 \cdot s/a \text{ (Equação 3)}$$

Portanto, foram obtidas curvas analíticas, em diferentes faixas de concentrações ($n = 5$ pontos), faixa contendo o limite de detecção experimental das diferentes frações de proteínas e, em seguida, calculados os respectivos parâmetros das curvas. O limite de detecção (LOD) foi definido como a concentração mais baixa do analito que poderia ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis.

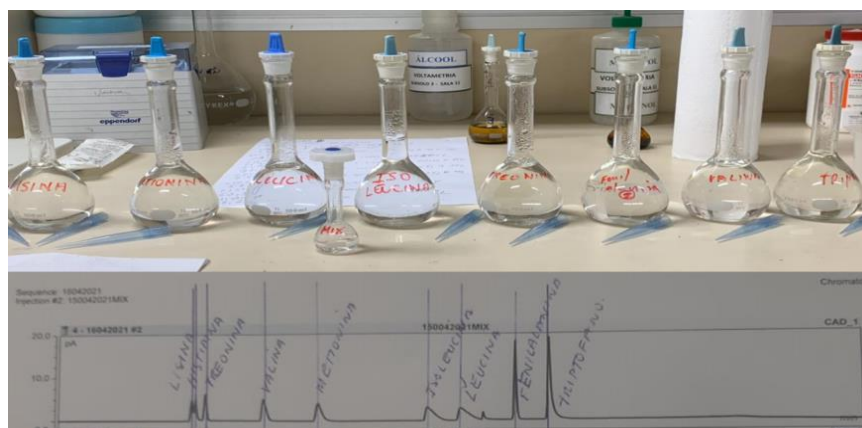
3.5 Identificação e quantificação dos aminoácidos essenciais por (CLAE-CAD)

A determinação dos aminoácidos essenciais foi realizada em amostras previamente hidrolisadas em meio ácido, seguida por identificação e separação por cromatografia líquida de alta eficiência bidimensional, acoplado aos detectores ultravioleta e aerossol carregado (CLAE-UV/CAD) e quantificação através do método de adição padrão.

3.5.1 Preparo dos padrões

Para cada padrão de aminoácido foi preparado uma solução estoque em concentrações variadas: 51,21 mg/100mL (Treonina), 62,87 mg/100mL (Lisina), 52,54 mg/100mL (Histidina), 50,62 mg/100mL (Valina), 60,17 mg/100mL (Metionina), 51,08 mg/100mL (Isoleucina), 52,30 mg/100mL (Leucina), 51,77 mg/100mL (Fenilalanina) e 52,58 mg/100mL (Triptofano), todos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A seguir, foram individualmente dissolvidos em água destilada e deionizada (Milli-Q[®], Millipore) e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água destilada e deionizada. A partir das soluções estoque foi preparado um *mix* com os nove padrões. Antes de serem injetadas no equipamento alíquotas foram filtradas em membrana MF-Millipore[®], hidrofílica, 0,22 μm , não estéril (Millipore, Massachusetts, EUA) (Figura 14).

Figura 14 – Preparo dos padrões de aminoácidos e corrida cromatográfica ilustrando a identificação de cada padrão



Fonte: (Arquivo pessoal).

3.5.2 Preparação das amostras

Para a preparo das amostras (Figura 15), as mesmas foram pesadas e diluídas com água destilada e deionizada levando em consideração as instruções de preparo presente nos rótulos. A seguir as amostras foram submetidas à hidrólise ácida, em tubos Pyrex (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) de acordo com o método de referência oficial descrito pela AOAC, 1994. Após etapa de ressuspensão das amostras, 10 mL da amostra juntamente com 10 mL do HCl 6 mol/L foi adicionado ao tubo, sendo posteriormente colocado para aquecer por 24 horas em estufa a 110°C. Após completar as 24 horas, o hidrolisado foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e avolumado com água destilada e deionizada. A seguir, alíquotas em triplicata foram filtradas em membrana MF-Millipore[®], hidrofílica, 0,22µm, não estéril (Millipore, Massachusetts, EUA).

Figura 15 - Hidrólise ácida das proteínas

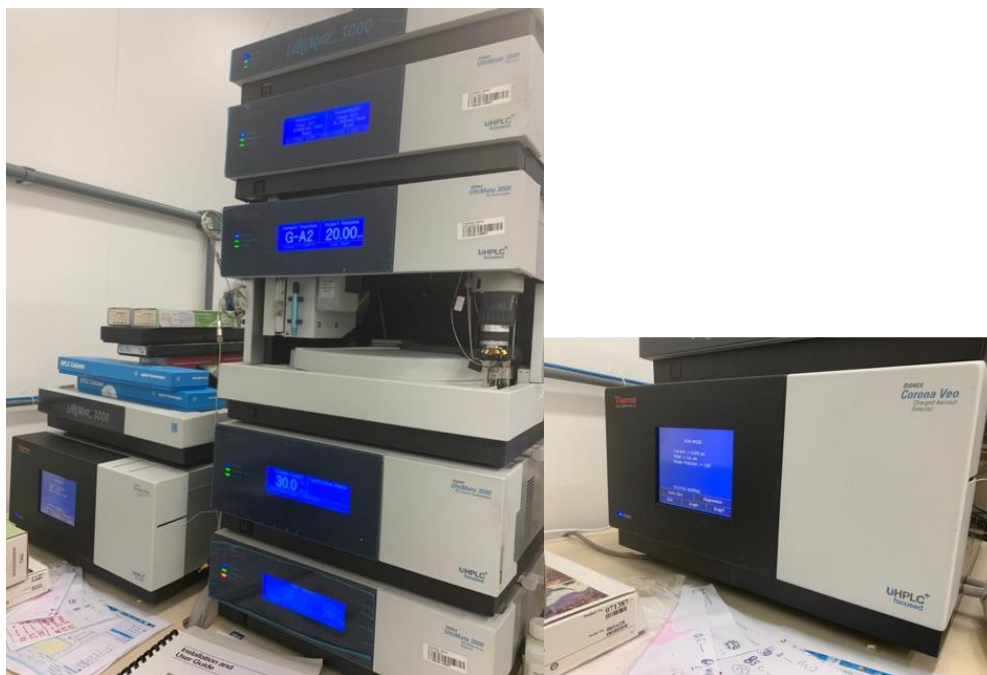


Fonte: (Arquivo pessoal).

3.5.3 Equipamento

Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida da marca Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 RSLCnano System (Thermo Fisher Scientific, USA) equipado com os seguintes detectores em sequência: detector UV/VIS com arranjo de diodos e Detector de Aerossol Carregado Corona ULTRA (CAD) (Corona Veo, Thermo Scientific®) (Figura 16). Foi utilizada cromatografia bidimensional, através de duas colunas conectadas em série: uma coluna ciano (150 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex®) conectada a uma coluna C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex®). Os dados foram adquiridos com o software Chromeleon 7.2.

Figura 16 - Cromatógrafo líquido ultimate 3000



Fonte: (Arquivo Pessoal).

3.5.4 Condições cromatográficas

A separação e a identificação dos nove aminoácidos essenciais não derivatizados foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Furota et al. (2018) com modificações. A eluição dos aminoácidos foi realizada na vazão de 0,5 mL/min usando uma mistura de dois solventes: o solvente A consistia em 0,1% de ácido fórmico (FOA) em água e o solvente B de 100% de acetonitrila (ACN). O gradiente de eluição foi (solvente B): 0% a 25% por 30 min, 25% a 70% de 31 a 46 min, e 70% a 0% de 47 a 60 min. O volume de injeção foi de 20 μ L, o tempo total de análise para cada amostra foi de 60 min e a temperatura da coluna foi mantida a 30°C.

3.5.5 Quantificação dos aminoácidos na amostra

A FI é uma matriz extremamente complexa, o que dificulta a identificação correta dos analitos de interesse em relação aos picos dos interferentes. Nesta análise, alguns picos de aminoácidos ficaram com baixa resolução, por isto optou-se por determinar a concentração dos aminoácidos nas amostras de forma indireta, através do método de adição de padrão. O método de adição de padrão é uma técnica normalmente utilizada para minimizar o erro sistemático da

análise, permitindo que qualquer interferente presente na amostra afete de forma similar o padrão, além de identificar com melhor precisão os analitos de interesse. Neste método, a curva de calibração é construída na amostra, sendo construída uma curva para cada amostra. Para isto, quantidades conhecidas do analito foram adicionadas a volumes fixos da amostra, conforme tabela 10 e a seguir o volume final foi completado com água destilada e deionizada.

Tabela 10 - Alíquotas utilizadas na adição padrão

	Diluição quantitativa
Amostra	1000 µl (amostra) + 500 µl (água)
Amostra + Padrão 1	1000 µl (amostra) + 450 µl (água) + 50 µl (mix)
Amostra + Padrão 2	1000 µl (amostra) + 400 µl (água) + 100 µl (mix)
Amostra + Padrão 3	1000 µl (amostra) + 350 µl (água) + 150 µl (mix)

As respostas instrumentais foram obtidas para cada uma das soluções (Amostra; Amostra + Padrão 1; Amostra + Padrão 2; Amostra + Padrão 3), obtendo-se a relação entre a quantidade de analito adicionada e a resposta instrumental. Para determinar a concentração dos aminoácidos na amostra levou-se em consideração os diferentes níveis de concentração do padrão (Tabela 11), as áreas das amostras e as áreas das amostras + padrão.

Os cálculos para determinar a massa experimental foram realizados para cada aminoácido individualmente levando em consideração as diferentes adições do padrão, conforme regra de três descrita abaixo. Após encontrar a massa experimental, calculou-se a concentração do aminoácido na amostra pesada.

Massa experimental (Padrão 1):

Conc. amostra ----- Área do pico amostra

Conc. amostra + Conc. padrão 1 ----- Área do pico padrão 1

Massa experimental (Padrão 2):

Conc. amostra ----- Área do pico amostra

Conc. amostra + Conc. padrão 2 ----- Área do pico padrão 2

Massa experimental (Padrão 3):

Conc. amostra ----- Área do pico amostra

Conc. amostra + Conc. padrão 3 ----- Área do pico padrão 3

Tabela 11 - Concentrações da adição padrão

Padrões	Amostra + Padrão 1 (50 µg/mL)	Amostra + Padrão 2 (100 µg/mL)	Amostra + Padrão 3 (150 µg/mL)
Triptofano	17,53	35,05	52,58
Valina	16,87	33,75	50,62
Treonina	17,07	34,14	51,21
Isoleucina	17,03	34,05	51,08
Leucina	17,43	34,87	52,3
Fenilalanina	17,26	34,51	51,77
Metionina	20,06	40,11	60,17
Lisina	20,96	41,91	62,87
Histidina	17,51	35,03	52,54

3.6 Valor biológico das proteínas

O valor biológico das proteínas foi verificado através dos principais parâmetros utilizados na avaliação da qualidade proteica, entre eles a digestibilidade, que neste estudo foi determinado através da bioacessibilidade (IVPD%), no qual corresponde à fração de um composto liberada a partir do alimento, tornando-o disponível para absorção pelo organismo; pela quantidade de aminoácidos essenciais; e através do cômputo químico (escore químico de aminoácidos e escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica), que é a medida da proporção de aminoácidos essenciais contidos na amostra em relação a um padrão pré-definido.

3.6.1 Bioacessibilidade (IVPD%)

A metodologia utilizada nas etapas de digestão foi baseada no protocolo descrito por Oomen et al. (2003) e Almeida et al. (2015a), com algumas adaptações. Todas as etapas das análises foram realizadas em triplicata e de forma independente. Ao final do representante de cada etapa da digestão (gástrica e intestinal), alíquotas foram coletadas para analisar a bioacessibilidade (IVPD%).

3.6.1.1 *Material e reagente necessários*

- Erlenmeyer de 50 mL;
- Incubadora, sistema que oferece agitação e aquecimento (Inckubater Unimax 1010, Heidolph®);
- PHmetro (Phmetro Micronal B474);
- Reagentes necessários para elaboração do Fluido Gástrico e Fluido Intestinal:
 - NaCl - Cloreto de sódio P.A.
 - NaH₂PO₄ - Fosfato monossódico P.A.
 - KCl - Cloreto de potássio P.A.
 - CaCl₂ - Cloreto de cálcio P.A.
 - NH₄Cl - Cloreto de amônio P.A.
 - Glicose (D-(+)-Glucose P.A. – Sigma-Aldrich®)
 - Uréia (Urea for molecular biology – Sigma-Aldrich®)
 - Mucina (Mucin from porcine stomach – Sigma-Aldrich®)
 - Pepsina gástrica suína (Pepsin from porcine gastric mucosa – Sigma-Aldrich®)
 - BSA - Albumina bovina (Bovine Serum Albumin, pH < 5.0 – Sigma-Aldrich®)
 - NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio P.A.
 - KH₂PO₄ - Fosfato de monopotássio P.A.
 - MgCl₂ - Cloreto de magnésio P.A.
 - Bile suína - Pancreatina suína (Pancreatin from porcine pancreas – Sigma-Aldrich®)
 - HCL - Ácido clorídrico P.A.
 - Água MilliQ®

3.6.1.2 *Fase Gástrica*

Antes de iniciar a digestão *in vitro*, as amostras foram ressuspensas seguindo as recomendações presentes nos rótulos dos produtos. Para a simulação da fase gástrica, foram adicionados em um frasco erlenmeyer de 50 mL, 10 mL da amostra ressuspensa, e 10 mL do fluido gástrico artificial (preparo para 1L: 5,5 g de NaCl; 0,54 g de NaH₂PO₄; 1,64 g de KCl; 0,84 g de CaCl₂; 0,62 g de NH₄Cl; 1,3 g de glicose; 0,17 g de ureia; 6,0 g de mucina; 5,28 g de pepsina gástrica suína; 2,0 g de albumina bovina; e 16,6 mL de HCl). O pH foi ajustado para 2,0 com 5 mol/L HCl. Em seguida, os frascos foram selados e incubados a 37°C por 2 horas

sob agitação orbital a 1 g (260 rpm) (Figura 17). Após finalizar esta etapa, pegou-se uma alíquota de 5 mL para posterior análise. Para o branco, substituiu-se a amostra por 10 mL de água destilada e deionizada.

Figura 17 - Etapa da incubação na Fase Gastrointestinal



Fonte: (Arquivo pessoal).

3.6.1.3 Fase Intestinal

Para a simulação da fase intestinal, nos frascos da fase gástrica foram adicionados 1 mol/L NaHCO_3 para ajustar o pH da amostra para 6,0. Em seguida foi adicionado 10 mL do fluido intestinal artificial (preparo para 1L: 13,5 g de NaCl ; 7,98 g de NaHCO_3 ; 0,12 g de KH_2PO_4 ; 1,034 g de KCl ; 0,41 g de CaCl_2 ; 0,075 g de MgCl_2 ; 0,275 g de ureia; 50,0 g de bile suína; 8,0 g de pancreatina suína; 2,4 g de albumina bovina; e 0,37 mL de HCl). A seguir, os frascos foram novamente selados e incubados a 37°C por 2 horas sob agitação orbital a 1 g (260 rpm). Após conclusão desta etapa, pegou-se uma alíquota de 5 mL para posterior análise.

3.6.1.4 Bioacessibilidade (IVPD%)

Após conclusão da digestibilidade *in vitro*, coletou-se o sobrenadante de cada fase da simulação, e estimou-se o IVPD% com base no teor de nitrogênio usando o método micro-Kjeldahl AOAC 930.29 (AOAC, 2012). Os valores de IVPD foram calculados de acordo com a equação 4.

$$\text{Digestibilidade (\%)} = \frac{N_s - N_b}{N_s} \times 100 \text{ (Equação 4)}$$

N_s = Nitrogênio do sobrenadante

N_b = Nitrogênio do branco

3.6.2 Escore químico de aminoácidos (AAS) e escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS)

Para o cálculo do AAS e do PDCAAS, os valores do conteúdo de aminoácidos essenciais foram expressos em mg de aminoácido por grama de proteína e comparados com dois valores de referência, um publicado pela FAO/WHO (2007) e o outro publicado pelo Institute of Medicine (IOM, 2002). Em ambos os valores de referência utilizados, os conteúdos de aminoácidos das proteínas do LM foram utilizados como padrão de referência para definir as pontuações de aminoácidos. Dessa forma, o AAS foi calculado para cada aminoácido essencial e foi comparado com a referência para a necessidade diária de aminoácidos para crianças. Para o cálculo do PDCAAS, multiplicou-se o valor do escore químico de cada aminoácido essencial pela digestibilidade proteica (IVPD%).

3.7 Análise de minerais essenciais e metais potencialmente tóxicos

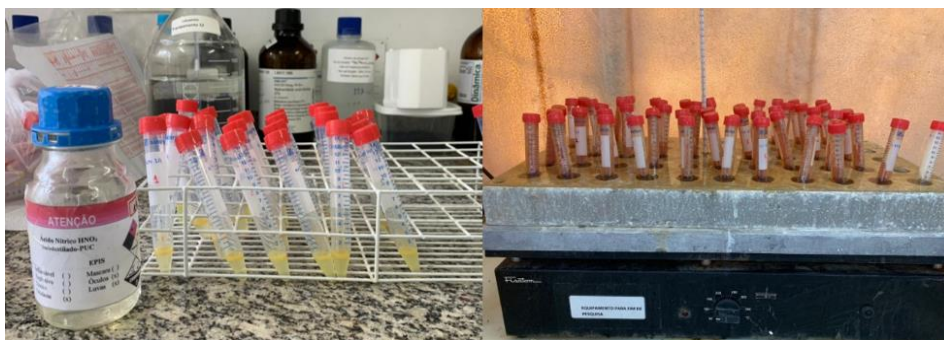
A determinação das concentrações dos minerais essenciais (Ca, Mg, Na, K, P, Fe, Zn, Cu, Cr, Mo, Se, I e Co) e elementos potencialmente tóxicos (Hg, As, Cd, Pb, Al e Sn) foram realizadas por Espectrometria de Massas por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS). A detecção do Fe mostrou interferência de poliatômicos com mesma massa. Desta forma, para a sua determinação foi necessário utilizar outro modo de análise do equipamento, chamado DRC (dynamic reaction cell), para neutralizar interferências espectrais, o que garantiu a

confiabilidade dos resultados. A concentração de cada mineral foi calculada com base em medições em quintuplicata (leitura pelo equipamento) realizadas para duas amostras paralelas de cada FI (n = 10).

3.7.1 Preparo das amostras

Aproximadamente 100 mg de cada amostra foi pesada em tubos de polietileno de 15 mL com tampa de rosca. Foi adicionado 1 mL de ácido nítrico bidestilado (Vetec, Rio de Janeiro) a cada amostra e a solução foi mantida em repouso *overnight*, com a tampa fechadas, à temperatura ambiente. No dia seguinte, a digestão em meio ácido foi concluída com aquecimento das amostras a 100°C, por aproximadamente 4 horas com a tampa fechada para evitar a volatilização de certos metais, como o Hg (Figura 18). Após o resfriamento, o volume foi ajustado para 10 mL com água ultrapura (resistividade > 18 MΩ cm) para posterior análises por ICP-MS, utilizando 103Rh como padrão interno a 20 mg/L.

Figura 18 - Extração dos minerais e metais com ácido nítrico e posterior aquecimento à 100°C

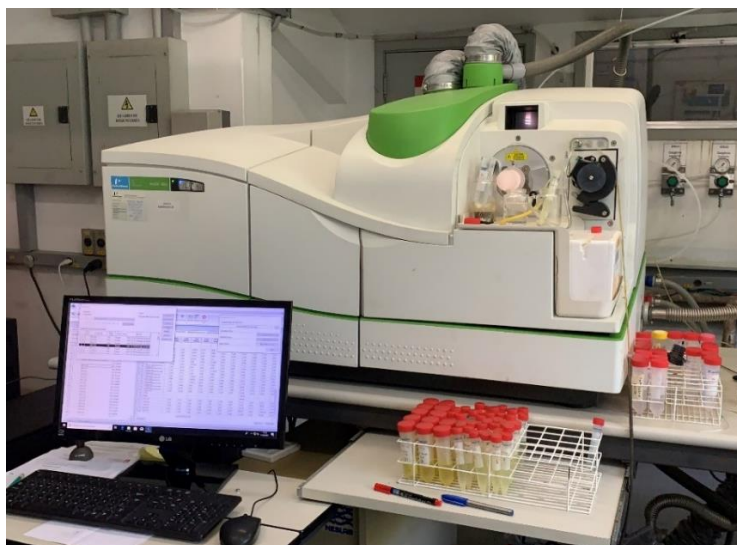


Fonte: (Arquivo pessoal).

3.7.2 Equipamento

Os elementos foram analisados em um ICP-MS sem o uso de cela de reação (exceto para a análise do Fe, no qual foi utilizado DRC), modelo Nexion 300x (Perkin Elmer-Sciex, Norwalk, CT, USA) (Figura 19). O sistema para introdução de amostra no plasma foi o sistema padrão fornecido pelo fabricante do ICP-MS e composto de nebulizador tipo Meinhard com câmara ciclônica e twister.

Figura 19 - ICP-MS NexIon 300x



Fonte: (Arquivo pessoal).

3.7.3 Condições operacionais e exatidão do método

As condições operacionais para determinação dos elementos estão descritas na tabela 12.

Tabela 12 - Parâmetros Operacionais do ICP-MS NexIon 300x

Parâmetro	Características
Potência de radiofrequência	1100 W
Amostrador e skimmer	Pt
Modo de varredura	Peak Hopping
Varreduras por leitura	5
Dwell time	50 ms por isótopo
Vazão do gás auxiliar	1.2 L/min
Vazão do gás plasma	17 L/min
Vazão do gás carreador	0,98 L/min

3.7.4 Concentrações dos metais nas amostras

As concentrações totais médias dos metais determinados em cada amostra de FI foram calculadas com base nos resultados obtidos para três amostras analisadas separadamente, usando calibração externa multi-elementar, e expressas em mg/100 mL.

Foi calculado o limite de detecção (LOD) para cada elemento levando em consideração os desvios padrão de dez medições realizadas para amostras em branco (SD blank) e inclinações (S) das curvas de calibração (de acordo com a equação: $LOD = 3 \text{ SD blank/S}$). Limites de quantificação (LOQ) foram calculados como multiplicação dos respectivos LOD ($LOQ = 10 \text{ LOD}$).

3.7.5 Exatidão do método analítico

Dois materiais de referência certificado Skimmed Milk Powder ERM[®]-BD150 (EC, Bélgica) e Milk Powder 1549 (NIST SRM, USA) foram usados para avaliar a exatidão dos resultados obtidos com o procedimento de preparação da amostra aplicado neste estudo, ou seja, digestão em meio ácido por aquecimento a 100°C por 4 horas, e como um controle de repetibilidade. A precisão das medições foi calculada com base nos resultados das determinações feitas para amostras individuais de cada material procedidas separadamente.

As soluções de calibração foram preparadas utilizando padrões Perkin Elmer 29 (Al, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Ga, Se, Cd e Pb). Curvas de calibração de cinco pontos dentro da faixa de concentração de 100 a 1000 µg/L foram usadas para avaliação da linearidade. Os respectivos coeficientes de correlação estavam dentro da faixa de 0,97–1,000. LODs e LOQs para todos os metais medidos foram determinados conforme descrito anteriormente.

3.7.6 Cálculo estimado da ingestão diária

As concentrações de minerais essenciais foram comparadas com a EAR, AI e com o UL, através da equação 5. O UL foi calculado apenas para o Fe, Zn e Se uma vez que um valor UL estabelecido para os outros minerais ainda não foram determinados (IOM, 2002).

$$ID = \frac{C_m \times C_d}{PM} \text{ (Equação 5)}$$

Onde:

ID é a ingestão diária estimada do mineral essencial, expresso em mg/dia/peso ou µg/dia/peso como apropriado para cada elemento; C_m é a concentração média do mineral essencial nas FIs, expresso em mg/mL ou µg/mL como apropriado para cada elemento; C_d é o consumo diário, no qual foi considerado as recomendações de consumo descritos no rótulo das amostras e PM é o peso médio de uma criança de 0 a 6 meses de idade no qual recomenda-

se o consumo de FIs de fase 1 e o peso médio de uma criança de 7 a 12 meses no qual recomenda-se o consumo de FIs de fase 2.

3.7.7 Avaliação da exposição de lactentes a metais potencialmente tóxicos

O cálculo da exposição (ingestão) a cada um dos metais considerados potencialmente tóxicos (Hg, Cd, Pb, Al e Sn) foi realizado para cada amostra, de acordo com o quociente de risco (QR) (Equação 6) (EPA, 2000). O QR é obtido a partir da razão entre a exposição aos contaminantes (taxa de ingestão da FI) e a dose oral de referência (RfD). O peso corpóreo da criança foi estimado a partir dos dados descritos na OMS (WHO, 2006). Para o consumo diário, levou-se em consideração que a FI foi o único alimento consumido. Para isto, foi considerada a média das recomendações de consumo diário descritos no rótulo das amostras (Tabela 13).

$$QR = \frac{FE \times DE \times TI \times C_{\text{metal}}}{RfD \times PMC \times TE} \text{ (Equação 6)}$$

Onde:

FE - frequência de exposição (182,5 dias/ano);

DE - duração da exposição (0,5 = 6 meses);

TI – taxa de ingestão de alimento (Tabela 13)

C_{metal} - Concentração do metal nas FIs (µg.g⁻¹);

RfD - Dose oral de referência/ingestão (µg/g/peso/dia);

PMC - peso médio corporal para idade de 0 a 6 meses e 7 a 12 meses (Tabela 13);

TE - tempo médio de exposição para não cancerígeno (FE x DE).

Tabela 13 - Recomendações de consumo diário descritos nos rótulos das amostras para cada faixa etária

Peso vs Idade		Fórmula Infantil (g/dia)				
Idade	Peso (Kg)	ME1	NC1	NN1	DM1	DA1
0-6 meses	6,1	117,5	123,5	125,1	111,9	117,5
Idade	Peso (Kg)	ME2	NC2	NN2	DM2	DA2
7-12 meses	9,1	137	131,6	98,7	128	137

Na avaliação do risco foi assumido que a dose oral de ingestão do contaminante é igual à dose absorvida pelo organismo infantil. Se o QR calculado for menor que 1,0, não existe risco evidente para metal analisado. Se o valor do QR for maior que 1,0 pode haver a possibilidade de efeitos prejudiciais à saúde infantil.

3.8 Conformidade da rotulagem

A conformidade dos rótulos à legislação vigente foi avaliada por um estudo transversal, com a análise de dados qualitativos e quantitativos (PEREIRA et al., 2018). O estudo da conformidade da rotulagem baseou-se na análise visual dos rótulos das FIs com a finalidade de verificar se os rótulos estavam dentro dos critérios definidos nas normas estabelecidas pela legislação brasileira emitidas pelo Ministério da Saúde (RDC 43/2011 e RDC 44/2011).

Para aquisição dos dados foi utilizado um *check-list* (Tabela 14) previamente elaborados de acordo com as regulamentações estabelecidas por normas gerais e leis específicas para esta classe de alimentos (BRASIL, 2002; BRASIL, 2003b; BRASIL, 2003c; BRASIL, 2006; BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b). O *check-list* de informações gerais sobre rotulagem de alimentos enumera critérios básicos que os fabricantes devem especificar em seus rótulos para que o produto possa ser comercializado e consumido de forma segura. A lista foi dividida em três grupos. O grupo 1 versa sobre informações de designação do produto, em que foi verificado se o produto apresenta a designação "Fórmula infantil para lactentes" (Fase 1) ou "Fórmula infantil de seguimento para lactentes" (Fase 2), e se é designado como "à base de leite de vaca". O grupo 2, diz respeito a informações das características essenciais de composição e qualidade, e o grupo 3, diz respeito às informações de rotulagem.

Os dados coletados foram tabulados em uma planilha Microsoft Office Excel, e os resultados expressos em porcentagem em relação ao número de conformidades e não conformidades.

Tabela 14 - *Check-list* baseada nas RDCs n° 43/2011 e n° 45/2011

DESIGNAÇÃO DO PRODUTO	
1	A FI apresenta a designação "FI para lactentes" no caso das FIs de Fase 1 e "FI de seguimento para lactentes" no caso das FIs de Fase 2?
2	Sendo o leite de vaca a única fonte de proteína, o produto é designado como "FI para lactentes à base de leite de vaca" no caso das FIs de Fase 1 e "FI de seguimento para lactentes à base de leite de vaca" no caso das FIs de Fase 2?

Continua

CARACTERÍSTICAS ESSENCIAIS DE COMPOSIÇÃO E QUALIDADE	
1	Todos os ingredientes, incluindo aditivos alimentares, são isentos de glúten?
2	As FIs para lactentes, assim como as FIs de seguimento para lactentes contêm, em 100 mL do produto pronto para o consumo, no mínimo 60 kcal (250 kJ) e no máximo 70 kcal (295 kJ) de valor energético?
3	É especificado no rótulo as quantidades mínimas de nutrientes ou outras substâncias em 100 kcal ou 100 kJ?
4	O conteúdo de proteína atende aos seguintes requisitos? FIs para lactentes à base de proteínas do leite de vaca hidrolisadas e não hidrolisadas, o teor mínimo deve ser de 1,8 g/100 kcal (0,45 g/100 kJ) e o teor máximo de 3,0 g/100 kcal (0,7 g/100 kJ), e para as FIs de seguimento para lactentes o teor mínimo deve ser de 1,8 g/100 kcal (0,45 g/100 kJ) e o teor máximo de 3,5 g/100 kcal (0,8 g/100 kJ).
5	O conteúdo mínimo de gorduras totais é de 4,4 g/100 kcal (1,05 g/100 kJ) e máximo de 6,0 g/100 kcal (1,4 g/100 kJ) nas FIs para lactentes, e de 4,0 g/100 kcal (0,96 g/100 kJ) e máximo de 6,0 g/100 kcal (1,4 g/100 kJ) nas FIs de seguimento para lactentes?
6	O conteúdo de ácidos graxos <i>trans</i> no produto não ultrapassa 3% do conteúdo total de ácidos graxos tanto nas FIs para lactentes, quanto para as FIs de seguimento para lactentes?
7	O conteúdo mínimo de ácido linoléico é de 300 mg/100 kcal (70 mg/100 kJ) e o seu limite superior de 1400 mg/100 kcal (330 mg/100 kJ) para as FIs para lactentes, assim como para as FIs de seguimento para lactentes?
8	O conteúdo mínimo de ácido alfa-linolênico é de 50 mg/100 kcal (12 mg/100 kJ), sem limite superior especificadora para as FIs para lactentes, assim como para as FIs de seguimento para lactentes?
9	A razão mínima de ácido linoléico/ácido alfa-linolênico é de 5:1 e a máxima de 15:1, tanto para as FIs para lactentes, assim como para as FIs de seguimento para lactentes?
10	O conteúdo mínimo de carboidratos totais é de 9,0 g/100 kcal (2,2 g/100 kJ) e o máximo de 14,0 g/100 kcal (3,3 g/100 kJ), tanto para as FIs para lactentes, assim como para as FIs de seguimento para lactentes?

11	O teor mínimo de lactose é de 4,5 g por 100 kcal (1,1 g/100 kJ) do produto pronto para o consumo?
12	As FIs para lactentes, assim como as FIs de seguimento para lactentes têm adição de sacarose? P.S. Esses ingredientes são adicionados apenas em FIs para lactentes produzidas com proteína hidrolisada.
13	As FIs para lactentes, assim como as FIs de seguimento para lactentes têm adição de glicose e xarope de glicose, desidratado ou não? P.S. Esses ingredientes são adicionados apenas em FIs para lactentes produzidas com proteína hidrolisada.
14	As FIs para lactentes, assim como as FIs de seguimento para lactentes têm adição de frutose e mel? P.S. Não é permitido a adição deste ingrediente em FIs para lactentes. No caso das FIs de seguimento para lactentes, caso seja adicionado mel, o produto deve ser designado conforme disposto no Artigo 9º da RDC nº 44, devendo o mel ser tratado apenas com o intuito de destruir os esporos de Clostridium botulinum.
15	O conteúdo de vitaminas, minerais e outras substâncias deve atender ao disposto nas RDC nº 43 e RDC nº 44. Valores este por 100 kcal do produto pronto para consumo:
15.1	Nutrientes:
	Ácido Fólico (10-50 mcg/100 kcal).
	Ácido Pantotênico (400-2000 mcg/100 kcal).
	Biotina (1,5-10 mcg/100 kcal).
	Niacina (Refere-se à niacina pré-formada) (300-1500 mcg/100 kcal).
	Riboflavina (80-500 mcg/100 kcal).
	Tiamina (60-300 mcg/100 kcal).
	Vitamina A (Expresso como retinol equivalente) (60-180 mcg RE /100 kcal).
	Vitamina B6 (35-175 mcg/100 kcal).
	Vitamina B12 (0,1-1,5 mcg/100 kcal (Fase 1) e 0,1-1,5mcg/100 kcal (Fase 2)).
	Vitamina C (Expresso como ácido ascórbico) (10-30 mcg/100 kcal).
	Vitamina D3 (1-2,5 mcg/100 kcal (Fase 1) e 1-3,0 mcg/100 kcal (Fase 2)).
	Vitamina E (0,5- 5 mg α -TE /100 kcal).
	Vitamina K (4-27 mcg/100 kcal).
	Cálcio (50-140 mg/100 kcal).
	Cloreto (50-160 mg/100 kcal).
	Cobre (35-120 mcg/100 kcal).
	Ferro (0,45-1,3 mg/100 kcal (Fase 1) e 0,9-2,0 mg/100 kcal (Fase 2)).
	Fósforo (25-100 mg/100 kcal).

	Iodo (10-60 mcg/100 kcal).
	Magnésio (5-15mg/100 kcal).
	Manganês (1-100 mcg/100 kcal).
	Potássio (60-180 mg/100 kcal).
	Selênio (1-9 mcg/100 kcal).
	Sódio (20-60 mg/100 kcal).
	Zinco (0,5-1,5 mg/100 kcal).
	Colina (7-50 mg/100 kcal).
	Mio-Inositol (4-40 mg/100 kcal).
	L-Carnitina (> 1,2 mg/100 kcal (FIs Fase 1) *FIs Fase 2 não especificado).
15.2	<p>Para a Vit., E, o conteúdo mínimo é de 0,5 mg alfa-TE por grama de PUFA, utilizando os seguintes fatores de equivalência para adaptar o conteúdo mínimo de Vit. E ao número de duplas ligações de ácidos graxos na fórmula:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 0,5 mg α-TE/g ácido linoléico (18:2 n-6); - 0,75 mg α-TE/g ácido alfa-linolênico (18:3 n-3); - 1,0 mg α-TE/g ácido araquidônico - ARA (20:4 n-6); - 1,25 mg α-TE/g ácido eicosapentaenoico - EPA (20:5 n-3); - 1,5 mg α-TE/g ácido docosaenoico - DHA (22:6 n-3).
16	Para FIs à base de proteínas isoladas de soja ou de misturas destas com proteínas lácteas, o limite máximo de ferro é de 2,0 mg/100 kcal (0,5 mg/100 kJ)?
17	A razão mínima de cálcio/fósforo é de 1:1 e a máxima de 2:1?
18	<p>Ingredientes opcionais:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Taurina (\leq 12 mg/100 kcal) - Nucleotídeos (\leq 5 mg/100 kcal) - DHA corresponde a 0,5% do conteúdo total de gorduras? - ARA atinge a mesma concentração do DHA? - EPA excede o conteúdo de DHA? - A quantidade adicionada de FOS e GOS ultrapassa o limite de 0,8 g/100 mL em uma combinação de 10% de FOS e 90% de GOS? - O conteúdo de bactérias viáveis (Probióticos) está entre 10^6 a 10^8 UFC/g do produto pronto para consumo?

ROTULAGEM	
1	A informação nutricional é declarada por 100 g ou 100 mL do alimento tal como exposto à venda, bem como por 100 mL do alimento pronto para consumo de acordo com as instruções do fabricante?
2	Adicionalmente, a informação nutricional é declarada por 100 kcal e por 100 kJ?
3	Quando adicionados os nutrientes DHA, ARA, taurina, nucleotídeos e/ou FOS e GOS, suas quantidades são declaradas na informação nutricional?
4	Quando probióticos forem adicionados, as quantidades são declaradas próximo à informação nutricional, por 100 mL do alimento pronto para consumo de acordo com as instruções do fabricante?
5	Não existe informação nutricional complementar e de alegações de propriedades funcionais ou de saúde nos rótulos?
6	Os produtos são rotulados de forma a evitar confusão entre as FIs para lactentes, FIs de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância, FIs para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e FIs de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas?
7	O rótulo das FIs para lactentes e de seguimento para lactentes contém as seguintes informações?
8	As fontes de proteína do produto, de forma clara.
9	Instruções adequadas de uso, preparo e conservação do produto, incluindo informações sobre higiene das mãos e superfícies de trabalho e necessidade de esterilização dos utensílios, de acordo com as recomendações atualizadas da OMS.
10	Instrução clara de que o produto deve ser preparado com água fervida e posteriormente resfriada a temperatura não inferior a 70°C, para produtos que necessitam de reconstituição.
11	O tempo médio de espera após a fervura para atingir a temperatura de diluição de 70°C.
12	Instruções sobre a importância de testar a temperatura da fórmula antes de administrá-la, a fim de evitar queimaduras.

13	Instruções sobre a importância do consumo imediato da fórmula reconstituída e a informação de que, quando necessário o preparo com antecedência do produto, a fórmula reconstituída deve ser refrigerada a uma temperatura menor que 5°C, por no máximo 24 horas.
14	Advertência de que os restos do produto preparado devem ser descartados.
15	Instruções claras ilustrando o método de preparação do produto.
16	Advertência sobre os perigos à saúde decorrentes do preparo, armazenamento e uso inadequados.
17	Instruções adequadas sobre a conservação do produto após abertura da embalagem.
18	As FIs para lactentes com probióticos apresentam nos dizeres de rotulagem a seguinte frase de advertência, em destaque e negrito: “Este produto contém probióticos e não deve ser consumido por lactentes prematuros, imunocomprometidos (com deficiências no sistema imunológico) ou com doenças do coração”?
19	"O Ministério da Saúde informa: o aleitamento materno evita infecções e alergias e é recomendado até os 2 (dois) anos de idade ou mais".
20	O rótulo das FIs de seguimento para lactentes contém as seguintes informações "O Ministério da Saúde informa: após os 6 (seis) meses de idade continue amamentando seu filho e ofereça novos alimentos".

3.9 Análise estatística

As diferenças nos valores para o conteúdo de proteína total foram avaliadas usando uma análise de variância one-way (ANOVA) com medidas repetidas para identificar se há diferenças entre as FIs. As diferenças nas frações de proteína, aminoácidos essenciais, minerais e metais tóxicos entre as FIs e seus respectivos lotes foram investigadas usando uma análise de variância two-way (ANOVA) com medidas repetidas. Além disso, a diferença no IVPD%, AAS e PDCAAS entre as FIs de fase 1 e de fase 2 foi investigada usando uma análise de variância one-way (ANOVA) com medidas repetidas. Quando um F significativo foi encontrado, uma análise adicional *post hoc* de Bonferroni foi realizada. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os procedimentos estatísticos foram realizados no software Graphpad Prism versão 5 para Windows® (GraphPad Software, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Conteúdo total de proteínas

A Tabela 15 mostra os dados experimentais do conteúdo total de proteínas obtido para as FIs de fase 1 e FIs de fase 2 e seus três lotes. O conteúdo proteico das FIs de fase 1 variou de 9,7 g/100g (NC1A, NN1C) a 16,7 g/100g (DM1B), enquanto nas FIs de fase 2 o conteúdo de proteínas variou de 11,5 g/100g (DM2B) a 16,3g/100g (ME2B). Além disso, foi realizado um comparativo da homogeneidade entre os lotes de um mesmo fabricante. Estatisticamente, foi observado uma certa homogeneidade para a maioria das formulações, exceto entre os lotes das marcas ME1 ($p < 0,01$), ME2 ($p < 0,05$) e NN1 ($p < 0,01$). E, quando confrontado com o valor expresso nos respectivos rótulos, verificou-se uma variação no conteúdo de proteínas de mais de 20% do valor declarado para as amostras ME1C, ME2B, ME2C, NC1B, NC2A, NC2B, NC2C, NN1B, NN2B, NN2C, DM1A, DM1B, DM1C, DA1C, DA2A, DA2B e DA2C.

Levando-se em consideração as informações expressas no rótulo das FIs (g/100 Kcal), os valores para o conteúdo de proteínas de todas as marcas estavam de acordo com a legislação brasileira (RDC n° 43 e RDC n° 44). Quando comparado com os resultados obtidos experimentalmente (g/100 kcal), a maioria se encontrava dentro dos limites mínimos e máximos recomendados, exceto pelas as amostras ME1C, DM1A e DM1B no qual o conteúdo foi superior ao limite máximo.

Tabela 15 - Conteúdo total de proteínas (g/100 g) das diferentes marcas e seus lotes de FIs de fase 1 e FIs de fase 2 e as informações do conteúdo de proteínas expressas nos rótulos

FIs	Conteúdo Proteico		Informação Nutricional	
	g/100g	g/100 kcal	g/100g	g/100 kcal
ME1A	11,6±0,06	2,4		
ME1B	10,6±0,04**	2,2	9,7	2,0
ME1C ⁺	15,5±0,70**	3,2		
ME2A	13,8±1,21*	2,8		
ME2B ⁺	16,3±0,70	3,3	12,0	2,4
ME2C ⁺	15,1±2,01	3,1		
NC1A	9,7±2,04	1,9		
NC1B ⁺	13,8±2,40	2,7	9,3	1,8
NC1C	10,1±1,42	2,0		

Continua

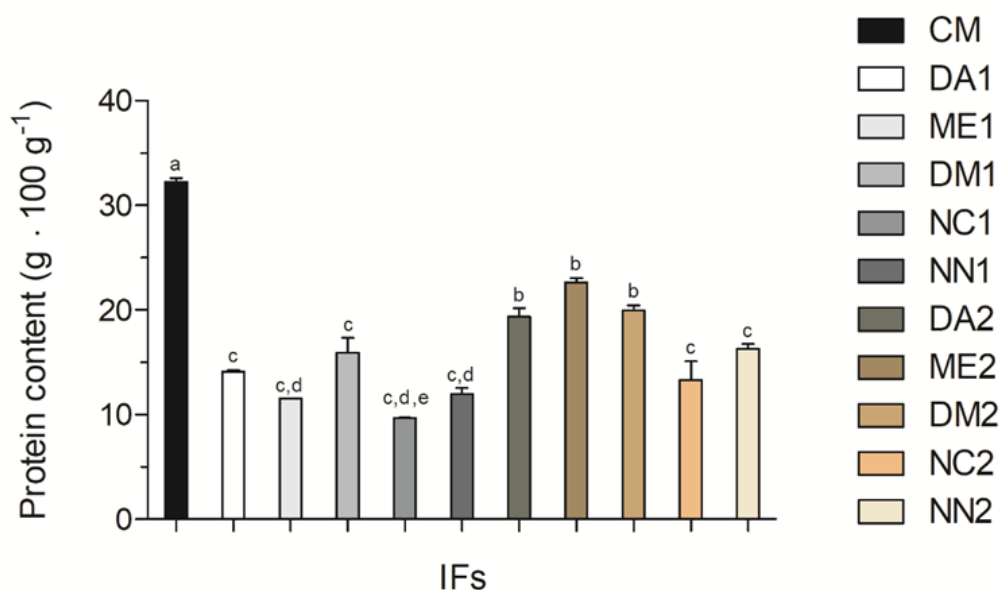
Continuação

FIs	Conteúdo Proteico		Conteúdo Proteico	
	g/100g	g/100 kcal	g/100g	g/100 kcal
NC2A ⁺	13,5±0,72	2,8		
NC2B ⁺	13,6±0,78	2,9	9,0	1,9
NC2C ⁺	15,4±1,75	3,2		
NN1A	11,9±0,66**	2,4		
NN1B ⁺	14,5±1,14**	2,9	11,0	2,2
NN1C	9,7±0,03**	2,0		
NN2A	13,2±0,92	2,8		
NN2B ⁺	14,6±0,71	3,1	11,0	2,3
NN2C ⁺	14,2±0,65	3,0		
DM1A ⁺	15,9±1,45	3,1		
DM1B ⁺	16,7±1,31	3,3	11,0	2,2
DM1C ⁺	14,6±3,21	2,9		
DM2A	15,5±0,73	3,2		
DM2B	14,5±0,92	2,4	14,0	2,9
DM2C	15,2±0,71	3,2		
DA1A	11,0±0,12	2,3		
DA1B	10,6±0,53	2,2	9,8	2,0
DA1C ⁺	12,4±1,67	2,6		
DA2A ⁺	14,5±0,69	3,2		
DA2B ⁺	13,8±2,54	3,0	11,0	2,4
DA2C ⁺	14,2±1,36	3,1		

Nota: Os valores estão expressos em média ± SD. O símbolo * denota diferença entre FIs do mesmo fabricante ($p < 0,05$) e o símbolo ** denota diferença entre os lotes da mesma marca ($p < 0,01$). As amostras com o sinal “+” apresentam uma discrepância em relação ao valor descrito no rótulo.

Ao avaliar o conteúdo de proteína total entre LV integral em pó, as FIs para lactentes (fase 1) e as FIs de seguimento para lactentes (fase 2) (Figura 20), observou-se que o conteúdo de proteína total médio para o LV (32,47±0,33 g/100g) foi maior quando comparado as FIs de fase 1 e FIs de fase 2. Entre as FIs, as formulações de fase 2 conhecidas como ME2 (15,6±0,56 g/100g), DM2 (14,17±0,71 g/100g) e DA2 (14,06±1,20 g/100g) apresentaram os maiores níveis de proteínas totais quando comparados às outras formulações da fase 2 e todas as formulações da fase 1. As FIs conhecidas como NC1 (9,67±0,03 g/100g) e NN1 (11,94±0,61 g/100g) apresentaram o menor teor de proteína total quando comparados as demais FIs analisadas ($p < 0,05$).

Figura 20 - Conteúdo médio total de proteínas (g/100 g) do LV integral e das diferentes marcas de FIs de fase 1 e fase 2



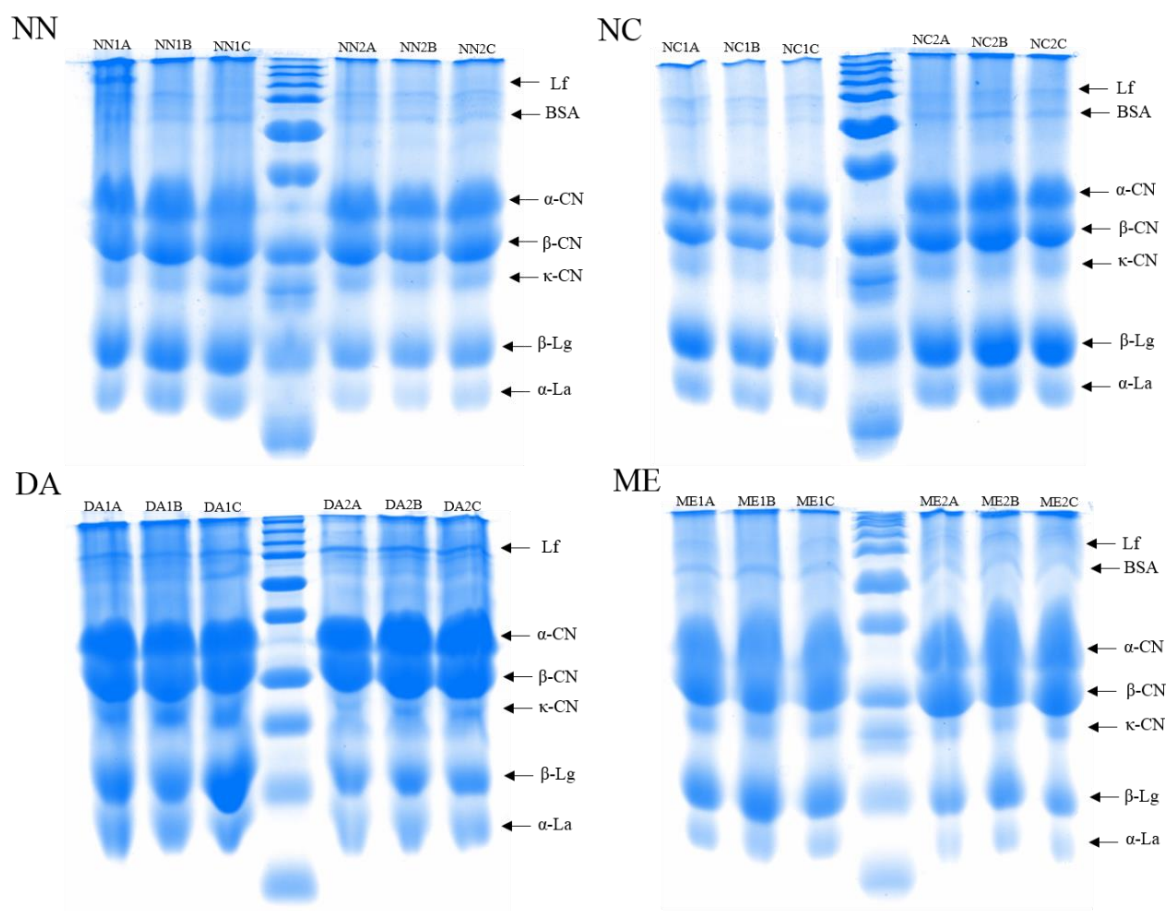
Nota: Os valores são expressos como médias \pm DP (n = 3). Letras diferentes entre as barras indicam diferenças entre as amostras a um nível de significância de $p < 0,05$. IFs (Fórmulas infantis).

4.2 Determinação e quantificação das frações proteicas majoritárias

4.2.1 Perfil proteico e abundância relativa

O perfil proteico das diferentes marcas de FIs foi determinado através da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) como ilustrado por géis representativos das amostras avaliadas na Figura 21. A partir do perfil eletroforético foi possível detectar bandas intensas com uma massa molecular aparente semelhante à Lf (80 kDa), α -CN (23 kDa), β -CN (27 kDa), κ -CN (19 kDa), β -Lg (18 kDa) e α -La (14,2 kDa). Outra banda correspondente às proteínas do soro, como a BSA (68 kDa), também foi identificada nos géis de algumas das formulações, conforme observado nas marcas NN, NC e ME. De forma geral, só foi possível confirmar nos géis as proteínas majoritárias, ou seja, aquelas que se encontram em maiores concentrações no leite, não sendo possível detectar proteínas que seriam de potencial interesse biológico menos abundantes e de menor peso molecular.

Figura 21 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das diferentes marcas de FIs e seus lotes



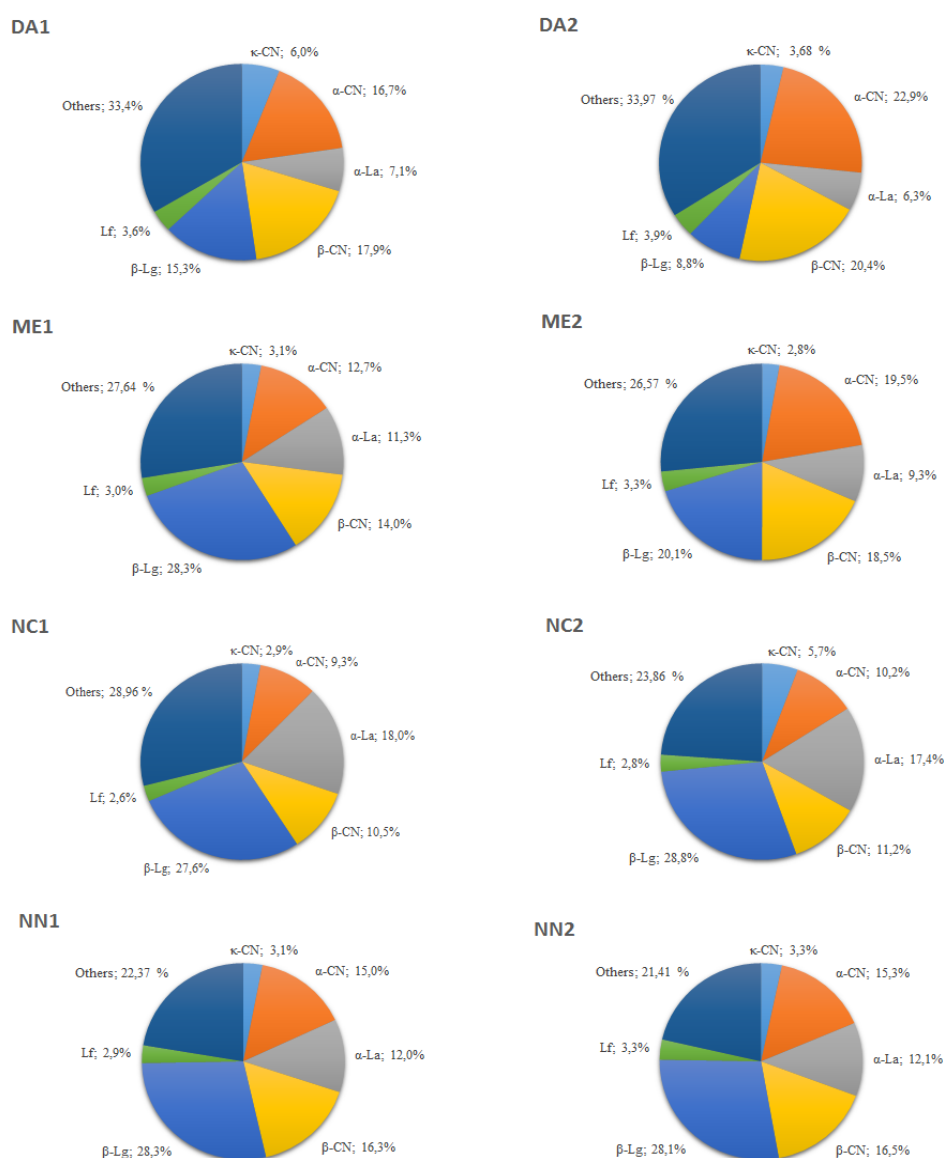
Nota: Os poços 1, 2 e 3 de cada gel representam FIs fase 1 (lotes A, B e C), os poços centrais correspondem aos padrões de peso molecular conhecido e os poços 5, 6 e 7 representam FIs fase 2 (lotes A, B e C). Lf (Lactoferrina), BSA (Albumina de soro bovino), α -CN (α -caseína), β -CN (β -caseína), κ -CN (κ -caseína), β -Lg (β -Lactoglobulina), α -La (α -Lactoalbumina).

De acordo com o volume aparente determinado pelo software TotalLab Quant[®], foi possível estimar o percentual de cada fração de proteína identificada nos géis, o que revelou diferentes padrões em relação às marcas avaliadas e entre seus lotes. Ademais, foi possível determinar as proporções entre as proteínas solúveis no soro e as CNs (Figura 22). As bandas referentes às CNs totalizaram 22,8% (NC1), 27,2% (NC2), 34,4% (NN1), 35,1% (NN2), 40,6% (DA1), 47,0% (DA2), 29,8% (ME1) e 40,7% (ME2); enquanto as bandas referentes às proteínas do soro totalizaram 77,2% (NC1), 72,8% (NC2), 65,6% (NN1), 64,9% (NN2), 59,4% (DA1), 53,0% (DA2), 70,2% (ME1) e 59,3% (ME2).

Com relação às proteínas do soro, a β -Lg correspondeu à fração mais abundante dentre as frações identificadas, exceto nas marcas DA1 e DA2, enquanto que a Lf a fração menos

abundante, com exceção das marcas DA2 e ME2. Quanto as proteínas insolúveis no soro, a β -CN foi a fração de caseína mais abundante, exceto nas marcas DA2 e ME2 em que sobressaiu a α -CN, e, a menos abundante dentre elas foi a κ -CN. Além das proteínas marcadamente identificadas nos géis, o software TotalLab Quant[®] identificou indiretamente a presença de outras proteínas menores, referentes as proteínas minoritárias do soro do leite.

Figura 22 - Gráficos representando a porcentagem aproximada das frações identificadas nos géis das diferentes marcas de FIs



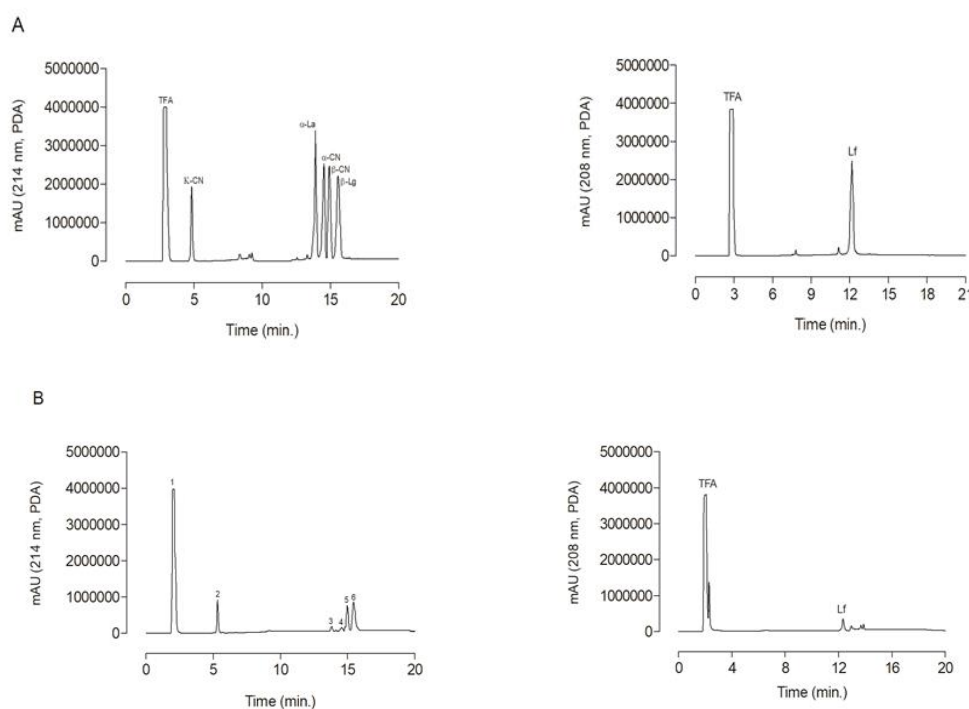
Nota: Lf (Lactoferrina), BSA (Albumina de soro bovino), α -CN (α -caseína), β -CN (β -caseína), κ -CN (κ -caseína), β -Lg (β -Lactoglobulina), α -La (α -Lactoalbumina).

4.2.2 Identificação e quantificação das proteínas majoritárias

Neste trabalho, os tempos de retenção dos principais picos eluídos coincidiram com os tempos de retenção dos padrões de proteínas. Foi observado que as proteínas eluíram na seguinte ordem: κ -CN, α -La, α -CN, β -CN e β -Lg. Vale ressaltar que os padrões comerciais estavam disponíveis para uma mistura da α -CN, mas não para as frações α_{S1} -CN e α_{S2} -CN e que os padrões comerciais não tinham 100% de pureza, logo os perfis cromatográficos mostraram a contaminação dos padrões devido à presença de traços de outras proteínas do leite.

A separação correta de todas as principais CNs e proteínas do soro de leite foi alcançada com as condições de eluição aplicadas. Portanto, o conhecimento dos tempos de retenção dos principais picos eluídos possibilitou a quantificação de cada fração proteica nas amostras, conforme pode ser visto em um cromatograma representativo de uma das amostras (Figura 23).

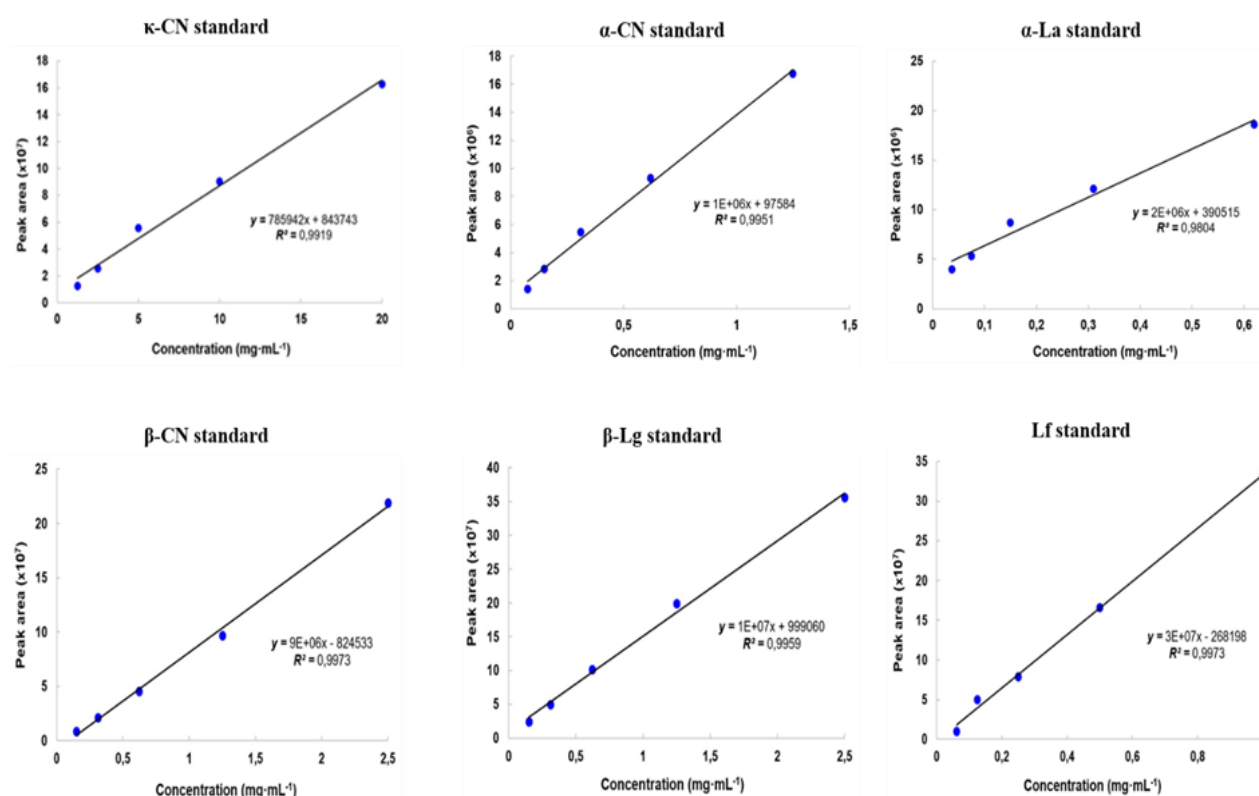
Figura 23 - Cromatograma representativo de uma mistura de padrões de proteína do leite bovino e lactoferrina (A) e cromatograma da análise das frações proteicas presentes em uma das amostra de FIs (B)



Nota: Tempos de retenção dos padrões de proteína. Figura A: κ -CN (5 min), α -La (14,1 min), α -CN (13,7-14,1 min), β -CN (14,5-14,8 min) e β -Lg (14,8-15 min). Figura B: 1: TFA, 2: κ -CN, 3: α -La, 4: α -CN, 5: β -CN e 6: β -Lg. Lf (Lactoferrina), BSA (Albumina de soro bovino), α -CN (α -caseína), β -CN (β -caseína), κ -CN (κ -caseína), β -Lg (β -Lactoglobulina), α -La (α -Lactoalbumina).

As curvas de calibração foram derivadas de parâmetros de regressão calculados para as diferentes concentrações injetadas das principais proteínas individuais do LV (Figura 24). Todas as seis frações de proteínas foram bem separadas com boa resolução de pico, nitidez e simetria. A repetibilidade foi encontrada a partir dos resultados de múltiplas medições de uma única amostra, mostrando um RSD entre 0,16-0,92% para tempos de retenção e 1,01-5,02% para áreas de pico. Em relação ao LOD e LOQ, as proteínas estudadas variaram de 0,01 a 0,15 mg/L e 0,28 a 1,02 mg/L, respectivamente. Além disso, a recuperação dessas proteínas variou de 88% a 97,4%.

Figura 24 - Curva padrão das frações de proteínas do leite de vaca identificadas por CLAE-DAD



Nota: κ-CN (1,25 a 20 mg/mL), α-CN (0,075 a 1,25 mg/mL), α-La (0,037 a 0,62 mg/mL), β-CN (0,15 a 2,5 mg/mL), β-Lg (0,15 a 2,5 mg/mL) e Lf (0,062 a 1,0 mg/mL). Lf (Lactoferrina), BSA (Albumina de soro bovino), α-CN (α-caseína), β-CN (β-caseína), κ-CN (κ-caseína), β-Lg (β-Lactoglobulina), α-La (α-Lactoalbumina).

Os valores médios das principais frações proteicas das FIs de fase 1 e das FIs de fase 2 são apresentados na Tabela 16. A comparação dos resultados da análise das frações proteicas entre todas as FIs de fase 1 e de fase 2 indicou claramente grande variabilidade ($p < 0,01$) na concentração das principais proteínas. Observou-se que as frações proteicas das FIs de fase 1

diferiram das FIs de fase 2. As FIs que apresentaram os maiores níveis de Lf foram DA2 ($3,8\pm 3,01$ mg/g), ME1 ($1,37\pm 0,15$ mg/g), DM1 ($1,37\pm 0,10$ mg/g), DA1 ($1,13\pm 0,15$ mg/g), os níveis mais altos de α -CN foram NC1 ($21,17\pm 2,74$ mg/g), ME2 ($18,5\pm 0,81$ mg/g), ME1 ($14,77\pm 2,02$ mg/g), DA2 ($14,71\pm 2,55$ mg/g) e DM2 ($13,51\pm 0,88$ mg/g), os maiores níveis de β -CN foram DM2 ($28,3\pm 3,96$ mg/g), DM1 ($25,16\pm 3,37$ mg/g), e NN2 ($22,23\pm 3,62$ mg/g), os níveis mais altos de κ -CN foram ME2 ($127,1\pm 3,90$ mg/g), NN1 ($115,53\pm 2,21$ mg/g) e NN2 ($113,1\pm 0,22$ mg/g), os níveis mais elevados de β -Lg foram NN1 ($39,83\pm 1,79$ mg/g), NN2 ($32,61\pm 3,91$ mg/g) e ME2 ($26,27\pm 3,17$ mg/g), e os níveis mais altos de α -La foram NN1 ($13,23\pm 0,41$ mg/g), NC1 ($12,10 \pm 1,21$ mg/g) e NN2 ($11,97\pm 0,87$ mg/g). Afim de verificar a diferença entre as frações proteicas presentes nas FIs de fase 1 e FIs de fase 2 com o LV, foi analisada uma amostra de leite em pó integral. O LV integral apresentou as maiores concentrações para α -CN ($43,6\pm 0,30$ mg/g), β -CN ($57,9\pm 0,50$ mg/g) e β -Lg ($56,6\pm 0,41$ mg/g) quando comparado com todas as FIs de fase 1 e de fase 2. No entanto, o LV integral apresentou a menor concentração de Lf ($0,3\pm 0,02$ mg/g) quando comparado com as FIs de fase 1 e de fase 2.

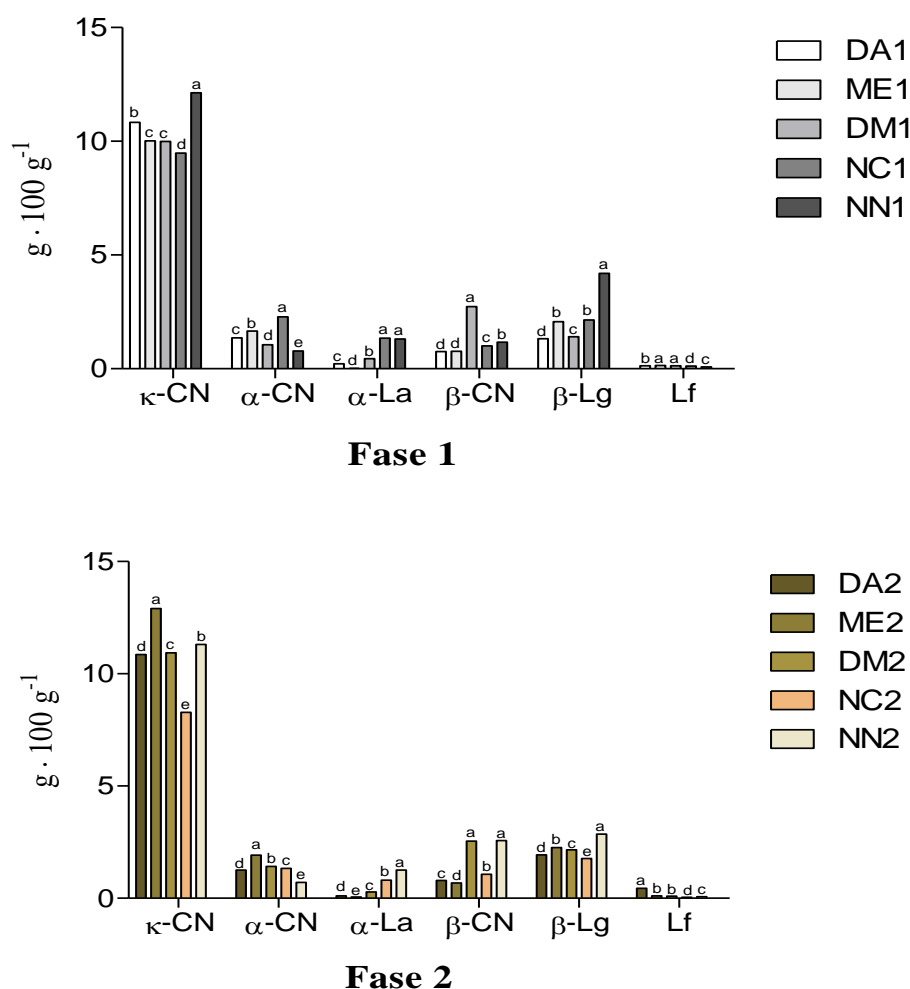
Tabela 16 - Concentração das proteínas majoritárias nas FIs de fase 1, FIs de fase 2 e do leite de vaca integral

FIs	Proteínas Majoritárias (mg/g)					
	Lf	α -CN	β -CN	κ -CN	β -Lg	α -La
ME1	$1,37\pm 0,15^b$	$14,77\pm 2,02^{d,e}$	$7,96\pm 0,55^f$	$100,50\pm 0,37^d$	$22,20\pm 1,35^{d,e}$	$0,33\pm 0,05^f$
ME2	$0,87\pm 0,07^c$	$18,50\pm 0,81^c$	$5,63\pm 1,06^g$	$127,1\pm 3,90^a$	$26,27\pm 3,17^{c,d}$	$0,57\pm 0,11^f$
NC1	$0,57\pm 0,27^d$	$21,17\pm 2,74^b$	$11,13\pm 0,90^d$	$89,90\pm 4,08^e$	$19,37\pm 1,76^e$	$12,10\pm 1,21^a$
NC2	$0,40\pm 0,11^e$	$13,37\pm 1,12^{d,e}$	$10,6\pm 0,11^e$	$88,17\pm 7,85^e$	$17,7\pm 1,75^{e,f}$	$7,57\pm 0,45^b$
NN1	$0,85\pm 0,04^c$	$7,60\pm 0,17^g$	$11,61\pm 0,01^d$	$124,50\pm 3,37^a$	$39,83\pm 1,79^b$	$13,23\pm 0,41^a$
NN2	$0,67\pm 0,15^{c,d}$	$7,23\pm 0,21^g$	$22,23\pm 3,62^c$	$115,53\pm 2,21^b$	$32,61\pm 3,91^c$	$11,97\pm 0,87^a$
DM1	$1,37\pm 0,10^b$	$11,17\pm 0,57^f$	$25,16\pm 3,37^{b,c}$	$100,23\pm 0,37^d$	$15,77\pm 1,66^f$	$3,93\pm 0,89^{c,d}$
DM2	$0,71\pm 0,20^{c,d}$	$13,51\pm 0,88^{d,e}$	$28,7\pm 3,96^b$	$103,47\pm 3,03^{c,d}$	$18,70\pm 2,66^{e,f}$	$2,10\pm 1,12^d$
DA1	$1,13\pm 0,15^b$	$12,57\pm 1,53^{e,f}$	$7,76\pm 0,31^f$	$106,53\pm 2,72^c$	$14,10\pm 2,30^f$	$3,40\pm 1,82^{c,d}$
DA2	$3,80\pm 3,01^a$	$14,71\pm 2,55^{d,e}$	$9,03\pm 1,10^f$	$107,17\pm 1,14^c$	$17,90\pm 2,08^{e,f}$	$1,07\pm 0,11^e$
LV	$0,31\pm 0,02^e$	$43,26\pm 0,30^a$	$57,95\pm 0,50^a$	$125,14\pm 0,39^a$	$56,62\pm 0,41^a$	$3,53\pm 0,13^c$

Nota: As análises foram realizadas em triplicata e os dados são apresentados como médias \pm DP. Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre FIs em um nível de significância $p < 0,01$. LV (leite de vaca integral), Lf (Lactoferrina), BSA (Albumina de soro bovino), α -CN (α -caseína), β -CN (β -caseína), κ -CN (κ -caseína), β -Lg (β -Lactoglobulina), α -La (α -Lactoalbumina).

A Figura 25 faz um comparativo entre as frações proteicas das marcas de FIs de fase 1 e das marcas de FIs de fase 2. De forma geral, as frações proteicas das FIs da mesma fase diferiram significativamente entre si ($p < 0,01$). Entretanto, entre as FIs de fase 1, as frações κ -CN e a Lf não diferiram entre as marcas ME1 e DM1, a α -La não diferiu para as marcas NC1 e NN1, a β -CN não diferiu para as marcas ME1 e DA1 e a β -Lg não diferiu para as marcas ME1 e NC1. Em relação às FIs de fase 2, apenas as frações β -CN entre as marcas DM2 e NN2, e Lf entre as marcas ME2 e DM2 não tiveram diferença significativa.

Figura 25 - Gráficos comparativos entre as FIs de fase 1 e entre as FIs de fase 2



Nota: κ -CN (κ -caseína), α -CN (α -caseína), α -La (α -Lactoalbumina), β -CN (β -caseína), β -Lg (β -Lactoglobulina), Lf (Lactoferrina).

A Tabela 17 mostra os valores médios das principais frações proteicas dos três lotes das marcas de FIs de fase 1 e das marcas de FIs de fase 2. Em geral, houve uma diferença significativa em relação às frações de proteína entre os lotes do mesmo fabricante, exceto para

Lf (NC1, NN1, DM1, DA1, ME2, NC2 e NN2), α -CN (NN2), β -CN (NN1 e NC2) e α -La (ME1, ME2 e DA2), revelando homogeneidade destas FIs para estas frações proteicas mencionadas.

Comparando o valor médio de cada fração proteica, observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre as marcas das FIs de fase 1 e das FIs de fase 2. Os valores médios para as FIs de fase 1 variaram de 86,0 a 129,8 mg/g (κ -CN), 7,5 a 22,8 mg/g (α -CN), 0,3 a 13,7 mg/g (α -La), 7,5 a 29,1 mg/g (β -CN), 13,2 a 41,9 mg/g (β -Lg) e 0,2 a 1,5 mg/g (Lf). Enquanto para as FIs de fase 2 variaram de 82,9 a 129,5 mg/g (κ -CN), 7,0 a 19,2 mg/g (α -CN), 0,5 a 12,5 mg/g (α -La), 4,7 a 33,1 mg/g (β -CN), 15,5 a 36,3 mg/g (β -Lg) e 0,3 a 8,5 mg/g (Lf). Em relação ao conteúdo médio das frações proteicas das FIs, a κ -CN foi a proteína mais abundante, e a α -La e a Lf as proteínas menos abundantes dentre as frações avaliadas.

Tabela 17 - Concentrações médias das frações proteicas dos diferentes lotes de FIs de fase 1 e FIs de fase 2

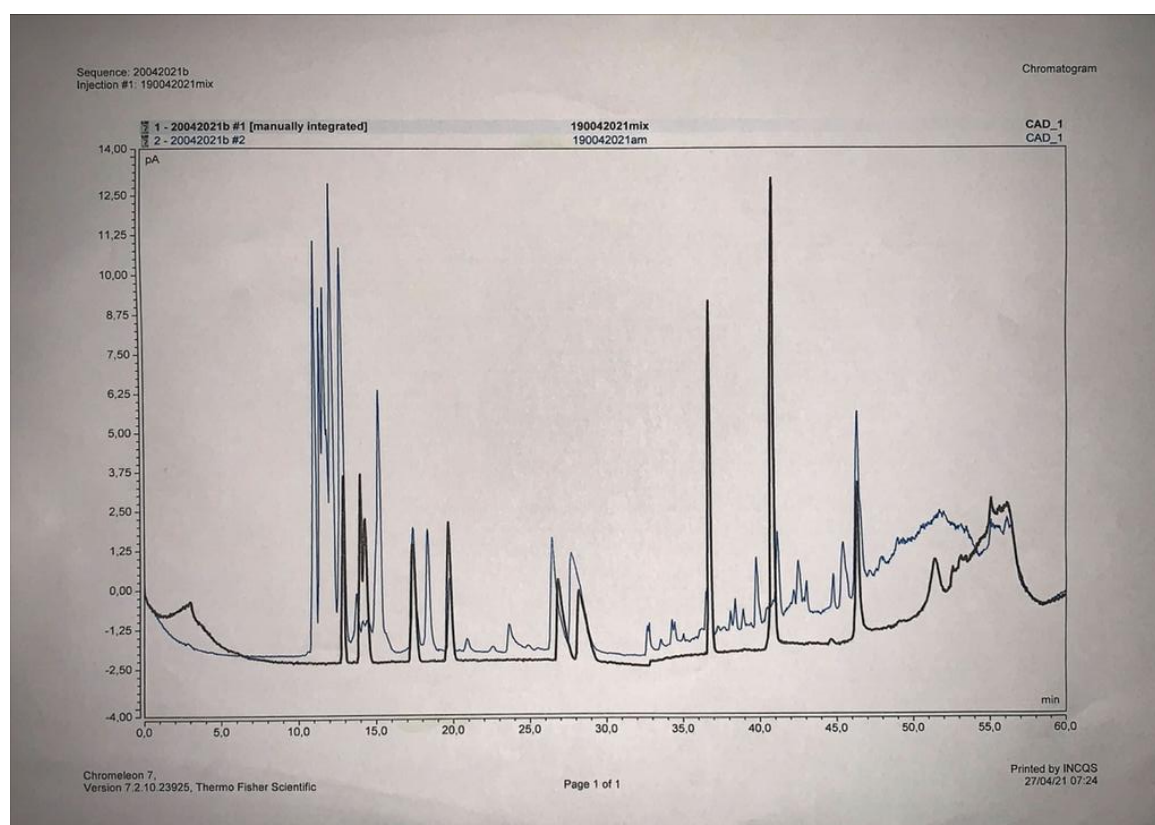
FIs	Proteínas Majoritárias (mg/g)					
	Lf	α -CN	β -CN	κ -CN	β -Lg	α -La
ME1A	1,5 \pm 0,07 ^a	16,6 \pm 0,01 ^a	7,6 \pm 0,01 ^b	100,2 \pm 0,02 ^b	20,6 \pm 0,01 ^b	0,3 \pm 0,02 ^a
ME1B	1,4 \pm 0,09 ^{a,b}	12,6 \pm 0,02 ^c	8,6 \pm 0,02 ^a	100,3 \pm 0,02 ^b	22,9 \pm 0,01 ^a	0,4 \pm 0,01 ^a
ME1C	1,2 \pm 0,11 ^b	15,1 \pm 0,01 ^b	7,7 \pm 0,01 ^b	100,9 \pm 0,01 ^a	23,0 \pm 0,03 ^a	0,3 \pm 0,01 ^a
NC1A	1,0 \pm 0,17 ^a	22,8 \pm 0,01 ^a	10,1 \pm 0,02 ^b	94,8 \pm 0,02 ^a	21,4 \pm 0,01 ^a	13,4 \pm 0,02 ^a
NC1B	1,2 \pm 0,15 ^a	18,0 \pm 0,04 ^b	11,5 \pm 0,06 ^a	86,0 \pm 0,01 ^c	18,4 \pm 0,03 ^b	11,4 \pm 0,04 ^b
NC1C	1,4 \pm 0,16 ^a	22,7 \pm 0,05 ^a	11,8 \pm 0,04 ^a	88,9 \pm 0,04 ^b	18,3 \pm 0,04 ^b	11,2 \pm 0,02 ^b
NN1A	0,7 \pm 0,05 ^a	7,8 \pm 0,01 ^a	11,6 \pm 0,04 ^a	121,2 \pm 0,07 ^c	41,9 \pm 0,04 ^a	13,1 \pm 0,01 ^b
NN1B	0,8 \pm 0,03 ^a	7,5 \pm 0,02 ^b	11,5 \pm 0,02 ^a	129,8 \pm 0,04 ^a	38,7 \pm 0,02 ^b	13,7 \pm 0,03 ^a
NN1C	0,9 \pm 0,01 ^a	7,5 \pm 0,01 ^b	11,7 \pm 0,04 ^a	122,5 \pm 0,08 ^b	38,9 \pm 0,01 ^b	12,9 \pm 0,01 ^b
DM1A	1,4 \pm 0,01 ^a	10,5 \pm 0,05 ^b	27,3 \pm 0,03 ^b	99,8 \pm 0,01 ^b	14,0 \pm 0,04 ^c	4,4 \pm 0,01 ^a
DM1B	1,4 \pm 0,01 ^a	11,5 \pm 0,01 ^a	29,1 \pm 0,05 ^a	100,5 \pm 0,01 ^a	16,0 \pm 0,01 ^b	4,5 \pm 0,03 ^a
DM1C	1,3 \pm 0,01 ^a	11,5 \pm 0,02 ^a	19,1 \pm 0,09 ^c	100,4 \pm 0,03 ^a	17,3 \pm 0,08 ^a	2,9 \pm 0,02 ^b
DA1A	1,3 \pm 0,09 ^a	13,5 \pm 0,01 ^a	7,5 \pm 0,14 ^b	108,3 \pm 0,02 ^a	13,2 \pm 0,01 ^b	2,2 \pm 0,22 ^b
DA1B	1,1 \pm 0,11 ^a	13,4 \pm 0,02 ^a	8,1 \pm 0,02 ^a	103,4 \pm 0,02 ^b	15,6 \pm 0,01 ^a	2,5 \pm 0,01 ^b
DA1C	1,0 \pm 0,22 ^a	10,8 \pm 0,01 ^b	7,7 \pm 0,12 ^b	107,9 \pm 0,01 ^a	13,5 \pm 0,03 ^b	5,5 \pm 0,01 ^a
ME2A	1,0 \pm 0,09 ^a	19,2 \pm 0,01 ^a	6,8 \pm 0,02 ^a	129,0 \pm 0,01 ^b	22,6 \pm 0,02 ^b	0,5 \pm 0,01 ^a
ME2B	0,8 \pm 0,12 ^a	17,6 \pm 0,01 ^c	4,7 \pm 0,01 ^c	129,5 \pm 0,01 ^a	28,0 \pm 0,01 ^a	0,5 \pm 0,01 ^a
ME2C	0,8 \pm 0,12 ^a	18,7 \pm 0,02 ^b	5,4 \pm 0,01 ^b	122,5 \pm 0,02 ^c	28,2 \pm 0,01 ^a	0,7 \pm 0,01 ^a
NC2A	0,5 \pm 0,21 ^a	13,3 \pm 0,02 ^b	10,7 \pm 0,05 ^a	82,9 \pm 0,04 ^c	17,7 \pm 0,02 ^b	8,0 \pm 0,02 ^a
NC2B	0,3 \pm 0,05 ^a	12,4 \pm 0,01 ^c	10,5 \pm 0,04 ^a	97,2 \pm 0,02 ^a	19,3 \pm 0,01 ^a	7,6 \pm 0,02 ^a
NC2C	0,4 \pm 0,11 ^a	14,4 \pm 0,06 ^a	10,7 \pm 0,07 ^a	84,4 \pm 0,02 ^b	15,8 \pm 0,01 ^c	7,1 \pm 0,02 ^b
NN2A	0,6 \pm 0,11 ^a	7,0 \pm 0,02 ^b	25,6 \pm 0,01 ^a	113,1 \pm 0,02 ^c	28,5 \pm 0,05 ^c	12,5 \pm 0,01 ^a
NN2B	0,7 \pm 0,06 ^a	7,3 \pm 0,02 ^{a,b}	22,7 \pm 0,02 ^b	116,1 \pm 0,04 ^b	33,0 \pm 0,01 ^b	11,6 \pm 0,02 ^b
NN2C	0,7 \pm 0,06 ^a	7,4 \pm 0,01 ^a	18,4 \pm 0,06 ^c	117,4 \pm 0,03 ^a	36,3 \pm 0,07 ^a	11,8 \pm 0,01 ^b
DM2A	0,9 \pm 0,01 ^a	14,2 \pm 0,02 ^a	25,4 \pm 0,02 ^c	109,3 \pm 0,01 ^a	21,5 \pm 0,05 ^a	2,8 \pm 0,02 ^a
DM2B	0,9 \pm 0,07 ^a	13,8 \pm 0,05 ^b	27,6 \pm 0,03 ^b	100,9 \pm 0,03 ^b	18,4 \pm 0,01 ^b	2,7 \pm 0,03 ^a
DM2C	0,2 \pm 0,02 ^b	12,5 \pm 0,01 ^c	33,1 \pm 0,03 ^a	100,2 \pm 0,01 ^c	16,2 \pm 0,02 ^c	0,8 \pm 0,05 ^b
DA2A	8,5 \pm 0,04 ^a	12,5 \pm 0,01 ^b	7,9 \pm 0,01 ^c	108,5 \pm 0,02 ^a	19,3 \pm 0,01 ^a	1,0 \pm 0,12 ^a
DA2B	1,5 \pm 0,02 ^b	17,5 \pm 0,02 ^a	9,1 \pm 0,01 ^b	107,3 \pm 0,01 ^b	18,9 \pm 0,01 ^b	1,2 \pm 0,11 ^a
DA2C	1,4 \pm 0,02 ^b	14,1 \pm 0,02 ^c	10,1 \pm 0,02 ^a	105,7 \pm 0,03 ^c	15,5 \pm 0,03 ^c	1,0 \pm 0,11 ^a

Nota: As análises foram realizadas em triplicata e os dados são apresentados como médias \pm DP. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre FIs ($p < 0,01$). Lf (Lactoferrina), α -CN (α -caseína), β -CN (β -caseína), κ -CN (κ -caseína), β -Lg (β -Lactoglobulina), α -La (α -Lactoalbumina).

4.3 Determinação e quantificação dos aminoácidos essenciais

Com a metodologia utilizada foi possível separar e identificar os nove aminoácidos essenciais. A cromatografia bidimensional demonstrou ser uma técnica excelente para separar analitos, que assim como os aminoácidos, apresentam alta variabilidade em suas estruturas químicas. Os tempos de retenção dos principais picos eluídos coincidiram com os tempos de retenção dos padrões de aminoácidos, verificando que os aminoácidos essenciais eluíram na seguinte ordem: treonina, lisina, histidina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina e triptofano. Portanto, o conhecimento dos tempos de retenção dos principais picos eluídos possibilitou a quantificação de cada aminoácido nas amostras, conforme pode ser visto nos cromatogramas apresentados na figura 26.

Figura 26 - Cromatograma de uma mistura de padrões de aminoácidos essenciais interposto em um cromatograma de uma das FIs



Nota: O cromatograma preto representa o *mix* de padrões de aminoácidos essenciais e o cromatograma azul representa uma amostra. Tempos de retenção dos padrões de aminoácidos essenciais: treonina (12,87 min), lisina (13,96 min), histidina (14,25 min), valina (17,33 min), metionina (19,67 min), isoleucina (26,86 min), leucina (28,24 min), fenilalanina (36,77 min) e triptofano (40,82 min).

Os valores médios do conteúdo de aminoácidos essenciais das FIs de fase 1 e das FIs de fase 2 são apresentados na Tabela 18. A concentração de histidina (variou de 0,11 a 0,15 mg/g) e triptofano (variou de 0,10 a 0,14 mg/g) foram semelhantes para todas as FIs de fase 1 e de fase 2. No entanto, observou-se que a marca DM1 apresentou o maior teor para valina ($1,34 \pm 0,02$ mg/g), metionina ($1,99 \pm 0,01$ mg/g), isoleucina ($1,69 \pm 0,01$ mg/g) e fenilalanina ($3,24 \pm 0,04$ mg/g) quando comparado a outras marcas de FIs de fase 1. As FIs de fase 1 DA1 ($4,34 \pm 0,01$ e $4,14 \pm 0,02$ mg/g) e DM1 ($4,19 \pm 0,02$ e $3,96 \pm 0,02$ mg/g) apresentaram o maior teor de treonina e leucina quando comparados as outras marcas de FIs de fase 1, respectivamente. Além disso, os maiores teores de lisina ($2,6 \pm 0,03$, $0,20 \pm 0,03$ e $0,20 \pm 0,04$ mg/g) foram encontrados em NN1, NC1 e ME1, respectivamente.

Em relação às FIs de fase 2, observou-se que a marca DM2 apresentou o maior teor para treonina ($4,70 \pm 0,02$ mg/g), metionina ($2,13 \pm 0,02$ mg/g), isoleucina ($1,99 \pm 0,01$ mg/g), leucina ($4,56 \pm 0,01$ mg/g) e fenilalanina ($3,28 \pm 0,02$ mg/g) quando comparados a outras marcas de FIs de fase 2. O maior teor de lisina ($0,19 \pm 0,01$ e $0,19 \pm 0,01$ mg/g) foi encontrado nas marcas NC2 e DM2, e o maior teor de valina ($1,29 \pm 0,03$, $1,27 \pm 0,01$ e $1,25 \pm 0,01$ mg/g) foi encontrado nas marcas NC2, NN2 e DM2, respectivamente.

Ao comparar os conteúdos de aminoácidos essenciais entre as FIs de fase 1 com as FIs de fase 2, em geral, foi observada uma diferença significativa ($p < 0,01$) onde as FIs de fase 1 apresentaram maiores conteúdos de aminoácidos como lisina, valina e isoleucina quando comparados as FIs de fase 2, enquanto as FIs de fase 2 apresentaram maior conteúdo de treonina, metionina, leucina e fenilalanina quando comparados as FIs de fase 1 (Tabela 18).

Tabela 18 - Concentração média dos aminoácidos essenciais das FIs de fase 1 e de fase 2 analisadas

Aminoácidos Essenciais	FIs de fase 1 (mg/g)					FIs de fase 2 (mg/g)				
	ME1	NC1	NN1	DM1	DA1	ME2	NC2	NN2	DM2	DA2
Treonina	3,93±0,02 ^{c,E}	3,08±0,03 ^{e,I}	3,18±0,01 ^{d,H}	4,19±0,02 ^{b,C}	4,34±0,01 ^{a,B}	4,07±0,02 ^{b,D}	3,24±0,01 ^{d,G}	3,04±0,02 ^{e,I}	4,70±0,02 ^{a,A}	3,72±0,02 ^{c,F}
Lisina	0,20±0,04 ^{a,A,B}	0,20±0,03 ^{a,A,B}	0,26±0,03 ^{a,A}	0,15±0,01 ^{b,C}	0,14±0,01 ^{b,C}	0,16±0,01 ^{b,C}	0,19±0,01 ^{a,B}	0,10±0,01 ^{c,D}	0,19±0,01 ^{a,B}	0,15±0,01 ^{b,C}
Histidina	0,15±0,01 ^{a,A}	0,14±0,01 ^{a,A}	0,13±0,01 ^{a,A}	0,14±0,03 ^{a,A}	0,14±0,04 ^{a,A}	0,12±0,02 ^{a,A}	0,14±0,01 ^{a,A}	0,16±0,02 ^{a,A}	0,16±0,02 ^{a,A}	0,11±0,03 ^{a,A}
Valina	0,33±0,01 ^{c,C}	1,23±0,03 ^{b,B}	1,27±0,01 ^{b,B}	1,34±0,02 ^{a,A}	0,27±0,05 ^{c,D}	0,35±0,01 ^{b,C}	1,29±0,03 ^{a,B}	1,27±0,01 ^{a,B}	1,25±0,01 ^{a,B}	0,26±0,02 ^{c,D}
Metionina	0,95±0,01 ^{e,F}	1,34±0,01 ^{c,D}	1,40±0,02 ^{b,C}	1,99±0,01 ^{a,B}	1,19±0,01 ^{d,E}	0,97±0,01 ^{d,F}	1,41±0,01 ^{b,C}	1,36±0,01 ^{c,D}	2,13±0,02 ^{a,A}	0,87±0,02 ^{e,G}
Isoleucina	0,94±0,02 ^{c,D}	0,90±0,03 ^{c,D}	0,90±0,04 ^{c,D}	1,69±0,01 ^{a,B}	1,32±0,02 ^{b,C}	0,96±0,03 ^{b,D}	0,90±0,03 ^{b,D}	0,81±0,01 ^{c,E}	1,99±0,01 ^{a,A}	0,91±0,02 ^{b,D}
Leucina	0,75±0,04 ^{d,G}	2,66±0,04 ^{c,E}	2,69±0,01 ^{c,E}	3,96±0,02 ^{b,C}	4,14±0,02 ^{a,B}	3,29±0,02 ^{b,D}	2,72±0,02 ^{c,E}	2,56±0,01 ^{d,F}	4,56±0,01 ^{a,A}	3,24±0,03 ^{b,D}
Fenilalanina	2,61±0,01 ^{b,C}	2,39±0,01 ^{c,E}	2,60±0,03 ^{b,C}	3,24±0,04 ^{a,A}	2,60±0,03 ^{b,C}	2,92±0,01 ^{b,B}	2,52±0,01 ^{d,D}	2,63±0,02 ^{c,C}	3,28±0,02 ^{a,A}	2,50±0,02 ^{d,D}
Triptofano	0,14±0,09 ^{a,A}	0,13±0,07 ^{a,A}	0,12±0,07 ^{a,A}	0,13±0,09 ^{a,A}	0,11±0,08 ^{a,A}	0,11±0,09 ^{a,A}	0,10±0,07 ^{a,A}	0,14±0,01 ^{a,A}	0,12±0,06 ^{a,A}	0,14±0,06 ^{a,A}

Nota: As análises foram realizadas em triplicata e os dados são apresentados como médias ± DP. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre FIs da mesma fase a um nível de significância $p < 0,001$. Letras grandes sobrescritas diferentes dentro da mesma linha indicam diferenças significativas entre as FIs de fase 1 e fase 2 em um nível de significância $p < 0,01$.

O conteúdo de aminoácidos essenciais do LM (RDCs n° 43/2011 e 44/2011) e o grau de conformidade (relação entre o conteúdo obtido em nosso estudo e o conteúdo recomendado) estão relatados na Tabela 19. Quase todas as FIs analisadas apresentaram conteúdo de aminoácidos essenciais inferiores aos valores estabelecidos pela legislação, exceto no caso da treonina nas amostras ME1 (81 mg/kcal), ME2 (83,1 mg/kcal), DM1 (82,6 mg/kcal), DM2 (97,3 mg/kcal), DA1 (89,8 mg/kcal) e DA2 (81,5 mg/kcal) em que os valores ficaram acima do valor de referência (77 mg/kcal), e da metionina nas amostras NC1 (26,7 mg/kcal), NC2 (29,8 mg/kcal), NN1 (28,2 mg/kcal), NN2 (29,0 mg/kcal), DM1 (39,4 mg/kcal), DM2 (44,2 mg/kcal) e DA1 (24,8 mg/kcal) que também ficaram acima dos valores de referência (24 mg/kcal).

Tabela 19 – Valores de aminoácidos em 100kcal das FIs de Fase 1 e Fase 2 e no LM

FIs	Kcal	Aminoácidos (mg/100kcal)								
		Thr	Lys	His	Val	Met	Iso	Leu	Phe	Trp
RDCs	100	77	114	41	90	24	92	169	81	33
ME1	486	81,0	3,8	3,1	6,9	19,7	19,4	15,6	53,8	3,0
NC1	505	61,0	3,7	2,8	24,4	26,6	17,7	52,8	47,5	2,6
NN1	497	64,1	5,4	2,6	25,7	28,2	18,3	54,2	52,7	2,6
DM1	508	82,6	3,1	2,9	26,5	39,4	33,4	78,0	63,2	2,7
DA1	484	89,8	2,9	2,9	5,6	24,8	27,3	85,6	53,9	2,4
ME2	490	83,1	3,3	2,5	7,3	19,9	19,7	67,2	59,7	2,4
NC2	474	68,5	4,1	3,1	27,2	29,8	18,8	57,6	53,3	2,3
NN2	472	64,4	2,2	1,3	26,9	29,0	17,2	54,3	55,9	3,2
DM2	483	97,3	4,1	3,4	26,0	44,2	41,4	94,6	68,1	2,5
DA2	457	81,5	3,3	2,6	4,8	19,2	19,5	70,6	53,7	3,1

Nota: Thr (Treonina), Lys (Lisina), His (Histidina), Val (Valina), Met (Metionina), Iso (Isoleucina), Leu (Leucina), Phe (Fenilalanina), Trp (Triptofano). RDCs n°43/2011 e 44/2011 (BRASIL, 2011a; BRASIL 2011b)

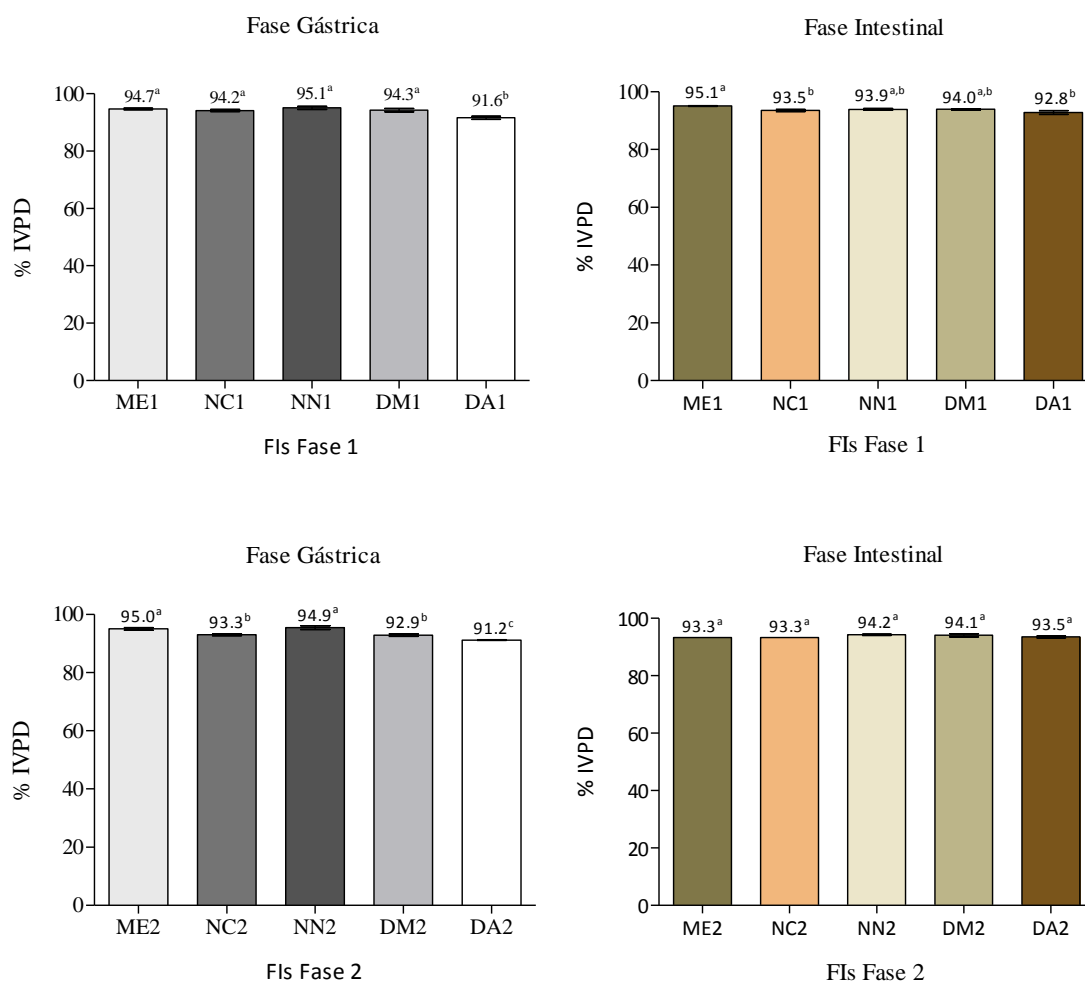
4.4 Avaliação biológica das proteínas

4.4.1 Bioacessibilidade (IVPD%)

A bioacessibilidade das FIs de fase 1 e de fase 2 determinada a partir do valor de nitrogênio total na fase gástrica e intestinal é apresentada na figura 27. Os valores obtidos para o IVPD% variaram entre 91,2% a 95,1% (fase gástrica) e 92,8% a 95,1% (fase intestinal). Após a digestão gástrica, ME1, NC1, NN1 e DM1 apresentaram valores de IVPD% maiores do que DA1. Na digestão intestinal, ME1 apresentou maiores valores de IVPD% do que NC1 e DA1. Entre as FIs de fase 2, ME2 e NN2 apresentaram os maiores valores de IVPD% quando

comparados a NC2, DM2 e DA2 após a digestão gástrica. No entanto, os valores de IVPD% após a digestão intestinal não mostraram diferenças significativas entre as FIs de fase 2.

Figura 27 - Percentual dos valores da digestibilidade proteica *in vitro* (IVPD%) das FIs de fase 1 e de fase 2



Nota: Os valores são expressos como médias \pm DP (n = 3). Letras diferentes denotam diferença em um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4.4.2 Escore químico de aminoácidos (AAS) e escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS)

Os valores obtidos para a composição dos aminoácidos essenciais das FIs foram calculados por grama de proteína teste (obtido pelo método de Kjeldahl), divididos pelos valores de aminoácidos recomendados pela FAO/OMS (2007) para crianças de 0 a 12 meses

(APÊNDICE A). Os resultados, denominado escore químico de aminoácido ou AAS, permitiu determinar os aminoácidos limitantes nas FIs (Tabela 20). As pontuações de aminoácidos variaram de 0,022-1,0 para as FIs de fase 1 e de 0,010-0,890 para as FIs de fase 2. Observou-se através dos valores obtidos no cálculo do AAS que todos os aminoácidos essenciais analisados nas FIs de fase 2 apresentaram escore químico inferior a 1,0. O mesmo resultado foi observado para as FIs de fase 1, exceto para o aminoácido treonina nas amostras ME1 ($1,0 \pm 0,005$ mg/g de PTN), NC1 ($1,0 \pm 0,010$ mg/g de PTN), DM1 ($1,0 \pm 0,007$ mg/g de PTN) e DA1 ($1,0 \pm 0,002$ mg/g de PTN). Em termos de valores de AAS, quase todos os valores de aminoácidos foram maiores ($p < 0,01$) em todas as FIs de fase 1 quando comparado as FIs de fase 2. O primeiro aminoácido limitante em todas as formulações foi a lisina, seguido pela histidina, e o aminoácido mais próximo de 1,0 foi a treonina em todas as amostras.

Os valores corrigidos pela digestibilidade proteica estão apresentados na tabela 21. O AAS determinado conforme descrito pela FAO/WHO (2007) foi corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS) com base no padrão de exigência de aminoácidos para a criança de 0 a 12 meses. Mesmo após a correção pela digestibilidade proteica, observou-se que os valores permaneceram numericamente inferiores a 1,0 para todos os aminoácidos presentes nas FIs de fase 1 e FIs de fase 2, revelando-se limitantes. Além disso, quase todos os valores de PDCAAS foram maiores ($p < 0,01$) em todas as FIs de fase 1 quando comparados com as FIs de fase 2.

Tabela 20 - Escore químico de aminoácidos (AAS) de FIs de fase 1 e fase 2 calculadas para crianças de 0 a 1 ano de idade

Aminoácidos Essenciais	FIs de fase 1					FIs de fase 2				
	ME1	NC1	NN1	DM1	DA1	ME2	NC2	NN2	DM2	DA2
Treonina	1,0±0,005 ^{a,A}	1,0±0,010 ^{a,A}	0,870±0,014 ^{b,B}	1,0±0,007 ^{a,A}	1,0±0,002 ^{a,A}	0,655±0,007 ^b	0,495±0,02 ^{c,D}	0,644±0,012 ^{b,C}	0,890±0,014 ^{a,B}	0,665±0,017 ^{b,C}
Lisina	0,025±0,003 ^{a,A}	0,030±0,003 ^{a,A}	0,035±0,007 ^{a,A}	0,030±0,014 ^{a,b,A,B}	0,022±0,002 ^{b,B}	0,010±0,003 ^{b,C}	0,020±0,001 ^{a,B}	0,012±0,002 ^{b,C}	0,020±0,001 ^{a,B}	0,015±0,005 ^{a,B}
Histidina	0,058±0,005 ^{a,b,A,B}	0,065±0,002 ^{a,A}	0,045±0,009 ^{c,B,C}	0,045±0,009 ^{b,B,C}	0,059±0,005 ^{a,b,A,B}	0,030±0,004 ^{b,C}	0,035±0,003 ^{b,C}	0,020±0,015 ^{b,C}	0,050±0,001 ^{a,B}	0,030±0,004 ^{b,C}
Valina	0,061±0,022 ^{c,E}	0,261±0,001 ^{a,A}	0,215±0,007 ^{b,B}	0,205±0,008 ^{b,B}	0,053±0,007 ^{c,E}	0,040±0,008 ^{c,E}	0,145±0,007 ^{b,D}	0,185±0,010 ^{a,C}	0,170±0,008 ^{a,C}	0,030±0,016 ^{c,E}
Metionina	0,263±0,001 ^{c,D}	0,436±0,013 ^{a,A}	0,365±0,007 ^{b,B}	0,445±0,008 ^{a,A}	0,357±0,003 ^{b,B}	0,170±0,001 ^{d,E}	0,240±0,027 ^{c,D}	0,306±0,019 ^{b,C}	0,450±0,021 ^{a,A}	0,172±0,001 ^{d,E}
Isoleucina	0,228±0,001 ^{c,D}	0,255±0,001 ^{b,C}	0,210±0,011 ^{d,E}	0,340±0,021 ^{a,B}	0,345±0,001 ^{a,B}	0,140±0,017 ^{b,F}	0,135±0,025 ^{b,F}	0,159±0,015 ^{b,F}	0,370±0,003 ^{a,A}	0,160±0,013 ^{b,F}
Leucina	0,088±0,001 ^{d,G}	0,368±0,001 ^{b,C}	0,285±0,008 ^{c,D}	0,375±0,020 ^{b,C}	0,523±0,003 ^{a,A}	0,235±0,010 ^{d,E}	0,200±0,007 ^{c,F}	0,243±0,001 ^{c,E}	0,410±0,003 ^{a,B}	0,270±0,008 ^{b,D}
Fenilalanina	0,387±0,007 ^{b,B}	0,419±0,023 ^{a,A}	0,370±0,010 ^{b,B}	0,380±0,007 ^{b,B}	0,418±0,001 ^{a,A}	0,265±0,006 ^{c,D}	0,230±0,001 ^{d,E}	0,317±0,029 ^{b,C}	0,375±0,011 ^{a,B}	0,265±0,008 ^{c,D}
Triptofano	0,133±0,009 ^{a,A}	0,143±0,001 ^{a,A}	0,105±0,009 ^{b,B}	0,115±0,003 ^{b,B}	0,112±0,06 ^{b,B}	0,070±0,002 ^{c,D}	0,060±0,011 ^{c,D}	0,111±0,011 ^{a,B}	0,082±0,008 ^{b,C}	0,091±0,001 ^{b,C}

Nota: As análises foram realizadas em triplicata e os dados são apresentados como média ± DP. Os valores próximos de 1,0 foram truncados. Letras minúsculas sobrescritas diferentes dentro da mesma linha indicam diferenças significativas entre as FIs da mesma fase a um nível de significância $p < 0,01$. Letras grandes sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as FIs de fase 1 vs as FIs de fase 2 a um nível de significância $p < 0,01$.

Tabela 21 - Escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS) de FIs de fase 1 e fase 2

Aminoácidos Essenciais	FIs de fase 1					FIs de fase 2				
	ME1	NC1	NN1	DM1	DA1	ME2	NC2	NN2	DM2	DA2
Treonina	1,0±0,007 ^{a,A}	1,0±0,007 ^{a,A}	1,0±0,010 ^{a,A}	1,0±0,009 ^{a,A}	1,0±0,007 ^{a,A}	0,595±0,005 ^{c,D}	0,575±0,020 ^{c,D}	0,580±0,014 ^{c,D}	0,850±0,014 ^{a,B}	0,635±0,009 ^{b,C}
Lisina	0,025±0,007 ^{b,B}	0,040±0,005 ^{a,A}	0,035±0,002 ^{a,A}	0,025±0,004 ^{b,B}	0,025±0,003 ^{b,B}	0,019±0,004 ^{b,B}	0,025±0,003 ^{b,B}	0,018±0,005 ^b	0,038±0,009 ^{a,A}	0,018±0,004 ^{b,B}
Histidina	0,055±0,013 ^{a,A}	0,065±0,010 ^{a,A}	0,045±0,010 ^{a,A,B}	0,050±0,010 ^{a,A}	0,055±0,012 ^{a,A}	0,030±0,005 ^{b,B}	0,030±0,006 ^{b,B}	0,015±0,007 ^{c,C}	0,045±0,018 ^{a,A}	0,030±0,007 ^{b,B}
Valina	0,065±0,018 ^{d,E}	0,255±0,013 ^{a,A}	0,210±0,07 ^{b,B}	0,180±0,005 ^{c,C}	0,055±0,012 ^{d,E}	0,040±0,028 ^{c,E}	0,135±0,001 ^{b,D}	0,175±0,007 ^{a,C}	0,165±0,011 ^{a,C}	0,035±0,015 ^{c,F}
Metionina	0,255±0,011 ^{c,D}	0,417±0,010 ^{a,A}	0,350±0,07 ^{b,B}	0,425±0,007 ^{a,A}	0,345±0,001 ^{b,B}	0,160±0,002 ^{d,E}	0,230±0,015 ^{c,D}	0,290±0,010 ^{b,C}	0,430±0,004 ^{a,A}	0,165±0,005 ^{d,E}
Isoleucina	0,225±0,012 ^{b,B}	0,245±0,010 ^{b,B}	0,180±0,012 ^{c,C}	0,319±0,015 ^{a,A}	0,325±0,011 ^{a,A}	0,140±0,011 ^{b,D}	0,135±0,011 ^{b,D}	0,150±0,011 ^{b,D}	0,350±0,018 ^{a,A}	0,150±0,009 ^{b,D}
Leucina	0,085±0,001 ^{d,F}	0,340±0,008 ^{b,B}	0,275±0,011 ^{c,C}	0,355±0,011 ^{b,B}	0,505±0,005 ^{a,A}	0,225±0,008 ^{b,D}	0,190±0,14 ^{c,E}	0,230±0,001 ^{b,D}	0,390±0,005 ^{a,B}	0,255±0,015 ^{b,C}
Fenilalanina	0,369±0,014 ^{b,B}	0,395±0,013 ^{b,B}	0,335±0,011 ^{d,C}	0,380±0,009 ^{b,B}	0,415±0,003 ^{a,A}	0,255±0,013 ^{c,D}	0,230±0,017 ^{c,D}	0,320±0,018 ^{b,C}	0,375±0,011 ^{a,B}	0,250±0,007 ^{c,D}
Triptofano	0,125±0,004 ^{b,B}	0,145±0,008 ^{a,A}	0,105±0,010 ^{c,C}	0,080±0,010 ^{d,D}	0,105±0,003 ^{c,C}	0,069±0,019 ^{b,D}	0,065±0,021 ^{b,D}	0,105±0,015 ^{a,C}	0,080±0,006 ^{b,D}	0,085±0,012 ^{b,D}

Nota: As análises foram realizadas em triplicata e os dados são apresentados como média ± DP. Os valores próximos de 1,0 foram truncados. Letras minúsculas sobrescritas diferentes dentro da mesma linha indicam diferenças significativas entre as FIs da mesma fase a um nível de significância $p < 0,01$. Letras grandes sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as FIs de fase 1 vs as FIs de fase 2 a um nível de significância $p < 0,01$.

4.5 Análise de minerais essenciais e metais potencialmente tóxicos nas FIs

4.5.1 Exatidão do método analítico utilizado

A exatidão do procedimento (metodologia utilizada na análise) de digestão em meio ácido por aquecimento a 100°C por 4h e medições pelo ICP-MS foram avaliadas pela análise de dois materiais de referência certificado (MRC) (Skimmed Milk Powder ERM®-BD150 e Non-Fat Milk Powder 1549). A comparação dos resultados experimentais com os valores dados nos dois MRCs atestou boa exatidão do procedimento aplicado na preparação das amostras para a maioria dos elementos analisados, exceto para o chumbo da MRC Milk Powder 1549, o que pode ter sido devido à presença de gordura neste material de referência. Os resultados desta análise são apresentados na Tabela 22.

Para a maioria dos elementos, a concordância entre as concentrações medidas e certificadas superiores a 10%, exceto para o Pb no MRC Milk Powder 1549, no qual o percentual de recuperação foi inferior a 10%, como observado na tabela 22.

Os limites de detecção dos metais potencialmente tóxicos foram Hg (0,0032 mg/L), As (0,0033 mg/L), Cd (0,0005 mg/L), Pb (0,0031 mg/L), Al (0,1290 mg/L), Sn (0,0015 mg/L) e U (0,0004 mg/L), enquanto os limites de quantificação foram Hg (0,0108 mg/L), As (0,0109 mg/L), Cd (0,0018 mg/L), Pb (0,0103 mg/L), Al (0,4301 mg/L), Sn (0,0051 mg/L) e U (0,0012 mg/L). Para os minerais essenciais, os limites de detecção foram Ca (28,2 mg/L), Mg (0,0099 mg/L), Na (0,0464 mg/L), K (0,1518 mg/L), P (0,7802 mg/L), Fe (0,0154 mg/L), Zn (0,0303 mg/L), Cu (0,0064 mg/L), Cr (0,0050 mg/L), Mo (0,0005 mg/L), Se (0,0452 mg/L), I (0,0061 mg/L), Co (0,0013 mg/L) e Mn (0,0012 mg/L), enquanto os limites de quantificação foram Ca (93,9 mg/L), Mg (0,0329 mg/L), Na (0,1547 mg/L), K (0,5059 mg/L), P (2,6006 mg/L), Fe (0,0512 mg/L), Zn (0,1011 mg/L), Cu (0,0214 mg/L), Cr (0,0165 mg/L), Mo (0,0017 mg/L), Se (0,1508 mg/L), I (0,0202 mg/L), Co (0,0043 mg/L) e Mn (0,0041 mg/L).

Tabela 22 - Resultado da análise e os valores certificados dos elementos presentes nos dois materiais de referência (Skimmed Milk Powder ERM[®]-BD150 e Non-Fat Milk Powder 1549) e o percentual de recuperação

Mineral	Material de Referência					
	Skimmed Milk Powder BD150 (mg/kg)			Milk Powder 1549 (mg/kg)		
	Observado ^a	Certificado ^a	Recuperação	Observada ^a	Certificado ^a	Recuperação
Na	3495,64±62,71	4180±190	83,63	4131±56	4970±100	83,13
Mg	1115,93±32,36	1260±100	88,57	999±18	1200±30	83,30
P	12190,22±556,01	1100±600	110,82	1181±253	10600±200	111,52
K	11499±6,16	17000±700	67,64	10592±142	16900±300	62,68
Ca	10767,55±670,43	13900±800	77,46	9518±336	13000±500	73,22
Fe	3,444±0,293	4,6±0,5	74,87	1,87±0,30		105,28
Cu	1,185±0,369	1,08±0,06	109,72	0,5±0,1	0,7±0,1	79,24
Zn	50,70±2,11	44,8±2	113,18	50,3±2,7	46,1±2,2	109,08
Se	-	0,199±0,014	-	0,11±0,24	0,11±0,01	100,38
Rb	-	-	-	10,41±0,20	11	94,64
Mo	-	-	-	0,31±0,06	0,34	91,54
Cd	0,015±0,015	0,0114±0,0029	127,65	-	-	-
Hg	0,071±0,0006	0,06±0,007	118,24	-	-	-
Pb	0,020±0,00023	0,019±0,004	103,29	0,011±0,01	0,019±0,03	57,49

Nota: Valor médio (n = 5) ± desvio padrão (DP).

4.5.2 Conteúdo de minerais essenciais nas FIs

O conteúdo médio dos macrominerais (Ca, Mg, Na, K e P) e microminerais (Fe, Zn, Cu, Cr, Mo, Se, I, Co e Mn) estudados nas FIs de fase 1 e das FIs de fase 2, estão apresentados na Tabela 23. A comparação dos resultados da análise de minerais entre todas as FIs de fase 1 e as FIs de fase 2 indicou grande variabilidade na concentração da maioria dos minerais, exceto para o Zn, Co e Mn em que não houve diferença significativa ($p < 0,01$).

Entre todos os macrominerais examinados, as maiores concentrações foram observadas para Ca, seguido pelo K, P e Na. As concentrações determinadas desses quatro minerais variaram de 259,1 mg/100g a 596,9 mg/100g, 309,3 mg/100g a 573,3 mg/100g, 180,3 mg/100g a 394,9 mg/100g e 101,4 mg/100g a 266,5 mg/100g, respectivamente. Entretanto, o Mg foi o macromineral com menor concentração, variando de 35,5 mg/100g a 60,4 mg/100g. Dentre os microminerais, as maiores concentrações foram observadas para Cr, seguido pelo Mo, Fe e Zn. As concentrações determinadas variaram de 23,8 mg/100g a 46,5 mg/100g, 4,74 mg/100g a 31,43 mg/100g, 4,8mg/100g a 8,2 mg/100g, 3,6 mg/100g a 5,6mg/100g, respectivamente.

Enquanto os o microminerais com menores concentrações foram o Co, seguido pelo Cu, Mn, I e Se. As concentrações para estes microminerais variaram de 0,72 mg/100g a 1,44 mg/100g, 0,21 mg/100g a 0,46mg/100g, 0,26 mg/100g a 0,36 mg/100g, 0,04mg/100g a 0,44mg/100g e 0,01 mg/100g a 0,44 mg/100g, respectivamente. De forma geral, observou-se que a marca ME2 foi a que apresentou as maiores concentrações para os minerais Ca, K, P e Mo, enquanto a marca NC1 foi a que apresentou as menores concentrações para Ca, Na, K, P.

Ao analisar individualmente os valores obtidos entre os lotes da mesma marca e entre os diferentes fabricantes (Tabela 24) observou-se grande variabilidade ($p < 0,01$), exceto para o Se e I, no qual não houve variação entre os seus lotes, provavelmente por serem os minerais em menor concentração. Dentre as FIs analisadas, as amostras NC1C, NN1C, NC2B e NN2A, foram as únicas no qual o mineral Se não foi detectado, uma vez que seu valor estava abaixo do LQ (LQ = 0,0051). Em relação a concentração de macrominerais nos lotes do mesmo fabricante, não houve diferença entre os lotes em relação ao Ca na marca ME2, do Mg nas marcas NC2, NN2, DM2 e DA2, do Na nas marcas ME2, NC2 e NN2, do K na marca NN2 e do P nas marcas NC1, NC2, NN2, DM2 e DA2. Entre os microminerais, não houve variação entre os lotes das marcas ME1, NC1, DM1, DA1 e ME2 para o Fe; das marcas NC1, NN1 e todos os lotes das FIs de fase 2 para o Zn; entre todas as marcas de FIs de fase 1 e as marcas NC2, NN2, DM2 e DA2 para o Cu; entre as marcas NC1, NN1, ME2, DM2 e DA2 para o Cr; entre as marcas de FIs de fase 1 e de fase 2 (exceto DA2) para o Mo; das marcas DM1, NC2 e DA2 para o Co; e das marcas NC1, NN1, DM1, DA1 e todos os lotes das FIs de fase 2 para o Mn.

Os resultados de ingestão diária obtidos para determinar, se a ingestão de um determinado mineral atende aos valores de referência às crianças de 0 a 6 (FIs de fase 1) e às crianças de 7 a 12 meses (FIs de fase 2) estão apresentados como arquivo suplementar (Apêndice B). Para os macrominerais das FIs de fase 1 o resultado médio variou de 282,9 mg/peso/dia (NC1C) a 514,7 mg/peso/dia (DA1C) para o Ca (AI = 210 mg/peso/dia); 35,9 mg/peso/dia (DA1A) a 75,8 mg/peso/dia (NC1B) para o Mg (AI = 30 mg/peso/dia); 125,2 mg/peso/dia (NC1A) a 238,3 mg/peso/dia (NN1B) para o Na (AI = não definido); 365,7 mg/peso/dia (DM1B) a 522,5 mg/peso/dia (ME1B) para o K (AI = 0,27 mg/peso/dia); e 219,1 mg/peso/dia (NC1C) a 372,8 mg/peso/dia (ME1B) para o P (AI = 100 mg/peso/dia). Enquanto para os microminerais das FIs de fase 1 o resultado médio variou de 5,9 mg/peso/dia (ME1B) a 7,5 mg/peso/dia (DM1C) para o Fe (AI = 0,27 mg/peso/dia); 2,9 mg/peso/dia (ME1C) a 5,9 mg/peso/dia (NN1B) para o Zn (AI = 2,0 mg/peso/dia); 0,2 mg/peso/dia (ME1B, ME1C) a 0,6

mg/peso/dia (ME1A) para o Cu (AI = 0,2 mg/peso/dia); 38577,5 mg/peso/dia (ME1B) a 23158,1 mg/peso/dia (DA1C) para o Cr (AI = 200 mg/peso/dia); 10,4 mg/peso/dia (NC1B) a 48,9 (ME1B) para o Mo (AI = 0,002 mg/peso/dia); 0,02 mg/peso/dia (ME1B, ME1C, NN1B, DA1C) a 0,05 mg/peso/dia (NC1C, NC1A, DM1B, DM1C, DA1B) para o Se (AI = 0,015 mg/peso/dia); 0,01 mg/peso/dia (ME1C) a 0,08 mg/peso/dia (NN1A, NN1B, NN1C) para o I (AI = 0,11 mg/peso/dia); 0,8 mg/peso/dia (NC1B, DM1A) a 1,3 mg/peso/dia (NN1C) para o Co (AI = 0,2 mg/peso/dia); e 0,3 mg/peso/dia (ME1A, DM1B, DM1C) a 1,0 mg/peso/dia (ME1B) para o Mn (AI = 0,003 mg/peso/dia).

Em relação aos macrominerais das FIs de fase 2 o resultado médio variou de 800,1 mg/peso/dia (ME2C) a 513,4 mg/peso/dia (NN2C) para o Ca (AI = 270 mg/peso/dia); 41,3 mg/peso/dia (DA2B) a 82,2 mg/peso/dia (NC2C) para o Mg (AI = 75 mg/peso/dia); 195,0 mg/peso/dia (DM2A) a 339,6 mg/peso/dia (ME2B) para o Na (AI = não definido); 467,8 mg/peso/dia (DM2A) a 795,8 mg/peso/dia (ME2B) para o K (AI = 11 mg/peso/dia); e 341,0 mg/peso/dia (DA2A) a 478,5 mg/peso/dia (ME2C) para o P (AI = 275 mg/peso/dia). Enquanto para os microminerais das FIs de fase 1 o resultado médio variou de 6,2 mg/peso/dia (NN2C) a 11,4 mg/peso/dia (DA2A) para o Fe (EAR = 6,9 mg/peso/dia); 3,1 mg/peso/dia (ME2B) a 7,2 mg/peso/dia (DM2A) para o Zn (AI = 3,0 mg/peso/dia); 0,2 mg/peso/dia (ME1B, ME1C) a 0,4 mg/peso/dia (NC2A, NC2B, NC2C, DA2A, DA2C) para o Cu (AI = 0,22 mg/peso/dia); 29703,3 mg/peso/dia (NN2B) a 59580,4 mg/peso/dia (DM2A) para o Cr (AI = 5500 mg/peso/dia); 6,1 mg/peso/dia (NC2B) a 43,7 (ME2B) para o Mo (AI = 0,003 mg/peso/dia); 0,02 mg/peso/dia (NN12) a 0,18 mg/peso/dia (DM12) para o Se (AI = 0,02 mg/peso/dia); 0,04 mg/peso/dia (DA2A, DA2B, DA2C) a 0,07 mg/peso/dia (ME2B, ME2C, NC2B, NN2B, DM2C) para o I (AI = 0,13 mg/peso/dia); 1,24 mg/peso/dia (ME2A) a 1,9 mg/peso/dia (ME2C) para o Co (AI = 0,22 mg/peso/dia); e 0,3 mg/peso/dia (NN2C) a 0,45 mg/peso/dia (ME2A) para o Mn (AI = 0,6 mg/peso/dia). A concentração de Se nas fórmulas NC1C, NN1C, NC2B e NN2A foi inferior ao limite de quantificação (LQ), ou seja, abaixo de 0,01508 mg/100g, logo não foi possível aplicar o cálculo de ingestão diária para este mineral nestas amostras.

Tabela 23 - Concentrações dos minerais (mg/100g) nas FIs de fase 1 e nas FIs de fase 2

FIs	Minerais (mg/100g)													
	Ca	Mg	Na	K	P	Fe	Zn	Cu	Cr	Mo	Se	I	Co	Mn
ME1	288,0±20,43 ^e	47,4±2,31 ^c	129,5±9,12 ^e	444,8±29,94 ^c	302,5±9,15 ^c	5,4±0,34 ^b	4,4±0,14 ^a	0,46±0,05 ^a	25,5±0,55 ^d	27,11±2,21 ^a	0,02±0,08 ^b	0,04±0,02 ^c	0,80±0,91 ^a	0,26±0,06 ^a
ME2	596,9±29,33 ^a	58,0±1,61 ^a	234,5±2,21 ^b	573,3±1,14 ^a	394,9±26,13 ^a	7,1±2,16 ^a	3,9±0,42 ^a	0,22±0,05 ^b	34,5±0,95 ^b	31,43±2,34 ^a	0,02±0,05 ^b	0,04±0,02 ^c	1,10±0,92 ^a	0,32±0,08 ^a
NC1	259,1±9,44 ^e	55,9±0,40 ^b	101,4±0,63 ^f	309,3±5,55 ^f	180,3±1,60 ^e	5,7±0,50 ^b	4,1±0,73 ^a	0,36±0,07 ^a	27,2±3,11 ^{c,d}	9,45±1,11 ^c	0,36±0,01 ^a	0,06±0,01 ^c	0,85±0,87 ^a	0,33±0,09 ^a
NC2	532,1±24,19 ^a	60,4±1,70 ^a	213,5±0,83 ^c	468,0±0,77 ^c	344,5±9,20 ^b	6,8±1,10 ^a	3,8±0,73 ^a	0,32±0,09 ^{a,b}	31,7±1,10 ^c	4,74±0,81 ^d	0,04±0,01 ^b	0,04±0,03 ^c	1,44±0,39 ^a	0,26±0,06 ^a
NN1	346,8±15,47 ^e	59,1±0,40 ^a	157,7±3,75 ^d	344,3±15,73 ^e	238,0±3,59 ^d	4,8±0,70 ^b	4,1±0,34 ^a	0,34±0,08 ^{a,b}	25,6±0,57 ^d	9,74±2,21 ^c	0,03±0,03 ^b	0,06±0,01 ^c	0,84±0,66 ^a	0,36±0,05 ^a
NN2	563,4±16,14 ^a	59,3±0,60 ^a	266,5±0,84 ^a	501,2±0,73 ^b	385,4±7,28 ^a	7,2±1,11 ^a	3,8±0,88 ^a	0,34±0,07 ^{a,b}	31,1±1,57 ^c	12,44±1,82 ^c	0,01±0,08 ^b	0,06±0,01 ^c	1,54±0,71 ^a	0,32±0,05 ^a
DM1	366,1±6,84 ^e	37,7±1,86 ^d	150,1±3,98 ^d	351,0±9,41 ^e	241,4±3,65 ^d	6,9±0,51 ^a	3,7±0,68 ^a	0,35±0,09 ^{a,b}	23,8±1,66 ^d	24,17±0,59 ^b	0,03±0,08 ^b	0,04±0,01 ^c	0,72±1,05 ^a	0,31±0,04 ^a
DM2	478,1±4,32 ^b	43,4±1,88 ^c	152,4±3,26 ^d	365,5±5,10 ^e	350,2±8,44 ^b	8,1±0,81 ^a	5,6±1,15 ^a	0,21±0,07 ^{b,c}	46,5±1,14 ^a	27,13±0,35 ^a	0,09±0,01 ^b	0,42±0,11 ^a	1,26±0,82 ^a	0,28±0,04 ^a
DA1	406,7±18,91 ^c	35,5±1,49 ^d	153,1±2,43 ^d	391,0±12,24 ^d	234,5±7,62 ^d	5,9±0,22 ^b	3,8±0,30 ^a	0,23±0,05 ^b	25,7±0,70 ^d	11,33±1,4 ^c	0,03±0,09 ^b	0,44±0,11 ^a	0,96±0,81 ^a	0,32±0,05 ^a
DA2	529,7±25,41 ^a	36,2±1,50 ^d	208,2±8,13 ^c	470,8±9,50 ^c	248,9±7,42 ^d	8,2±1,03 ^a	3,6±0,71 ^a	0,27±0,03 ^b	28,81±3,60 ^{c,d}	27,53±0,62 ^a	0,44±0,12 ^a	0,26±0,10 ^{a,b}	0,97±0,93 ^a	0,35±0,09 ^a

Nota: As análises foram realizadas em quintuplicata e os dados são apresentados como média ± DP. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as FIs em um nível de significância $p < 0,01$.

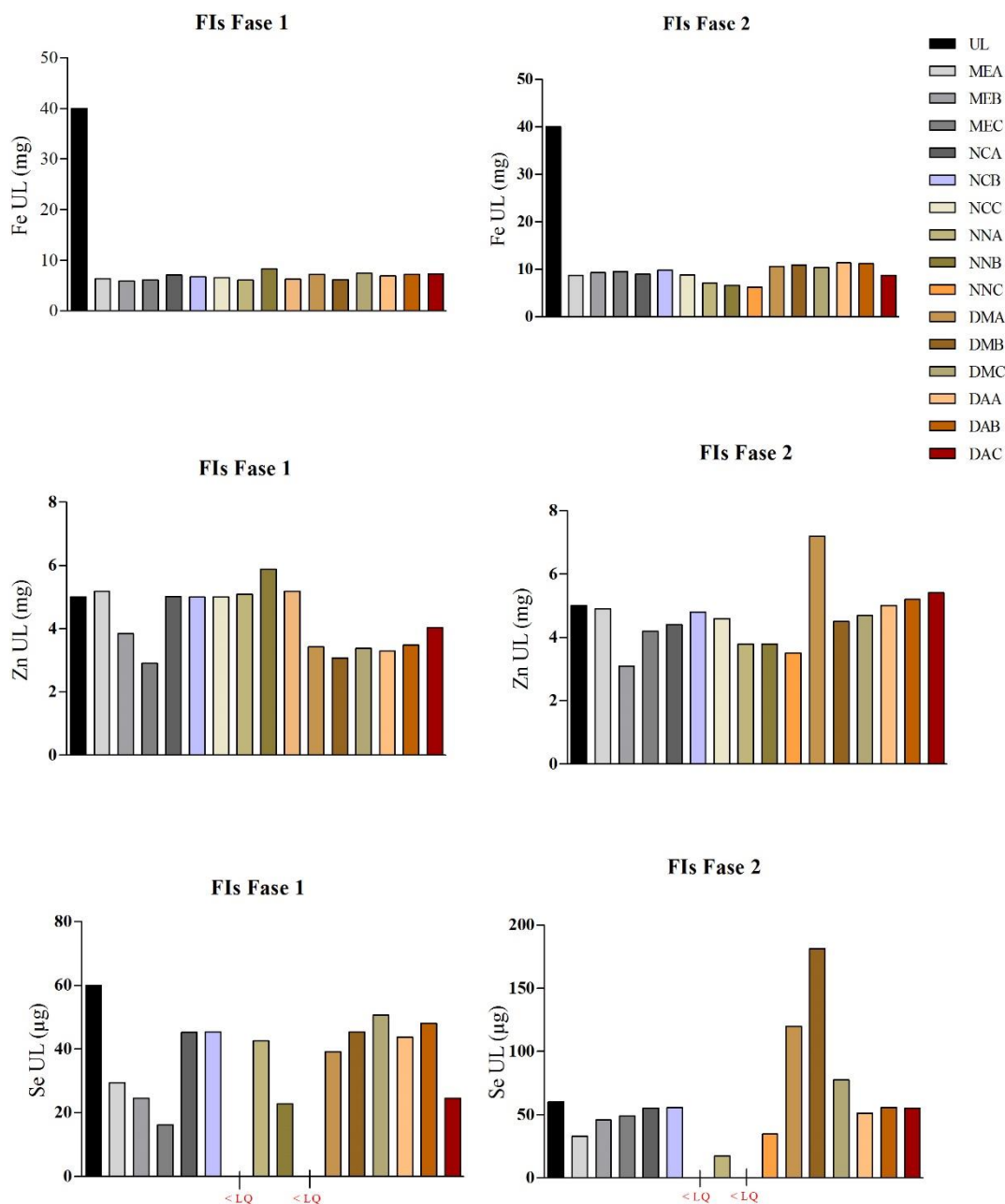
Tabela 24 - Concentração média dos minerais nos três lotes de FIs de fase 1 e fase 2

	Minerais (mg/100 g)													
	Ca	Mg	Na	K	P	Fe	Zn	Cu	Cr	Mo	Se	I	Co	Mn
	FIs de fase 1													
ME1A	287,94±20,4 ^{de}	47,45±2,4 ^d	129,40±9,2 ^e	444,71±29,9 ^a	302,52±9,1 ^a	5,41±0,1 ^a	4,40±0,1 ^a	0,50±0,21 ^a	25,50±5,0 ^{ab}	37,10±2,0 ^a	0,02±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	0,80±0,1 ^b	0,26±0,1 ^b
ME1B	409,81±18,6 ^b	48,04±0,1 ^d	143,18±3,1 ^d	386,52±5,8 ^b	317,30±27,8 ^a	5,30±0,2 ^a	3,24±1,1 ^a	0,27±0,18 ^{ab}	32,83±4,1 ^a	41,59±6,1 ^a	0,02±0,01 ^a	0,03±0,03 ^a	0,17±0,1 ^d	0,86±0,1 ^a
ME1C	372,55±2,3 ^c	43,73±1,2 ^e	155,84±2,3 ^c	359,37±12,5 ^{cd}	267,61±5,5 ^b	5,11±0,2 ^{ab}	2,41±0,2 ^c	0,24±0,11 ^{ab}	26,43±2,8 ^a	37,99±1,3 ^a	0,01±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	0,97±0,1 ^a	0,31±0,1 ^b
NC1A	229,15±9,4 ^f	55,92±1,4 ^c	101,41±5,6 ^f	309,24±5,5 ^e	197,31±1,1 ^f	5,71±0,5 ^a	4,68±0,7 ^a	0,36±0,11 ^{ab}	27,22±1,2 ^a	9,45±1,3 ^c	0,03±0,02 ^a	0,05±0,03 ^a	0,85±0,01 ^b	0,32±0,04 ^b
NC1B	289,42±8,5 ^e	61,44±0,4 ^a	144,37±2,8 ^d	359,52±12,8 ^c	198,33±1,4 ^f	5,44±0,3 ^a	4,35±0,2 ^a	0,35±0,12 ^{ab}	27,49±2,2 ^a	9,38±1,5 ^c	0,03±0,02 ^a	0,04±0,04 ^a	0,64±0,1 ^c	0,32±0,04 ^b
NC1C	232,15±29,2 ^f	54,56±2,6 ^c	108,81±4,6 ^f	319,61±32,8 ^d	187,31±12,9 ^f	5,31±0,9 ^a	4,51±0,1 ^a	0,34±0,13 ^{ab}	20,56±2,9 ^b	9,64±2,4 ^c	n.d.	0,05±0,1 ^a	0,70±0,1 ^c	0,34±0,1 ^b
NN1A	316,71±15,4 ^d	59,12±0,4 ^b	167,62±3,9 ^b	344,31±15,7 ^{cd,e}	238,31±1,5 ^d	4,81±0,1 ^b	4,71±0,1 ^a	0,34±0,10 ^{ab}	25,58±5,2 ^{ab}	8,74±2,3 ^c	0,03±0,01 ^a	0,06±0,01 ^a	0,84±0,03 ^b	0,36±0,02 ^b
NN1B	384,51±34,7 ^{b,c}	59,16±0,3 ^b	190,15±10,6 ^a	403,43±23,7 ^{ab}	233,61±3,2 ^d	5,61±0,2 ^a	4,79±0,5 ^a	0,41±0,10 ^a	23,03±1,8 ^b	10,69±3,2 ^c	0,03±0,01 ^a	0,06±0,03 ^a	0,84±0,1 ^b	0,38±0,02 ^b
NN1C	375,62±1,6 ^c	56,91±0,2 ^c	182,71±0,6 ^a	392,15±6,8 ^b	249,34±1,7 ^c	5,14±0,1 ^a	4,15±0,3 ^a	0,34±0,14 ^{ab}	23,57±1,1 ^b	10,90±1,9 ^c	n.d.	0,06±0,01 ^a	0,10±0,02 ^c	0,38±0,01 ^b
DM1A	366,15±8,8 ^c	37,76±1,1 ^f	148,14±1,3 ^d	331,31±9,4 ^e	248,42±0,4 ^c	5,45±0,6 ^a	3,54±0,2 ^b	0,31±0,13 ^{ab}	23,84±1,6 ^b	24,72±2,5 ^b	0,03±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	0,82±0,04 ^b	0,31±0,04 ^b
DM1B	392,13±8,7 ^b	38,61±0,4 ^f	133,64±3,7 ^e	326,87±2,7 ^e	262,15±0,1 ^b	5,41±1,4 ^a	2,71±0,1 ^c	0,31±0,23 ^{ab}	25,54±3,3 ^a	24,57±5,6 ^b	0,04±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a	0,78±0,1 ^b	0,30±0,01 ^b
DM1C	391,51±21,9 ^{b,c}	40,56±2,2 ^e	143,94±19,9 ^d	337,24±30,9 ^{cd}	265,51±2,2 ^b	5,63±0,8 ^a	3,34±0,5 ^b	0,30±0,11 ^{ab}	21,37±1,2 ^b	24,59±3,3 ^b	0,04±0,02 ^a	0,03±0,01 ^a	0,80±0,04 ^b	0,30±0,01 ^b
DA1A	406,61±18,9 ^b	30,56±0,6 ^e	153,13±2,5 ^c	391,04±12,2 ^b	230,43±7,6 ^d	5,83±0,3 ^a	2,83±0,2 ^c	0,23±0,04 ^b	25,74±7,7 ^a	11,33±4,8 ^c	0,03±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	0,86±0,02 ^b	0,32±0,1 ^b
DA1B	371,52±8,8 ^c	30,94±0,1 ^e	135,34±2,9 ^e	339,62±9,3 ^d	218,71±5,7 ^e	5,12±0,5 ^a	2,83±0,2 ^c	0,26±0,04 ^b	22,35±3,5 ^b	12,31±3,2 ^c	0,04±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	0,87±0,01 ^b	0,30±0,03 ^b
DA1C	438,55±3,4 ^a	35,71±3,45 ^f	152,62±4,1 ^c	361,81±10,8 ^{cd}	273,41±1,8 ^b	5,21±0,6 ^a	3,41±0,2 ^b	0,30±0,12 ^{ab}	19,71±3,1 ^b	9,93±2,2 ^c	0,03±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a	0,76±0,1 ^c	0,34±0,01 ^b
	FIs de fase 2													
ME2A	596,81±29,8 ^a	57,94±1,6 ^b	234,43±2,3 ^b	573,39±1,1 ^a	394,94±26,1 ^a	7,11±0,2 ^b	3,51±0,5 ^a	0,22±0,04 ^b	34,38±5,8 ^{b,c}	31,43±2,3 ^a	0,03±0,01 ^a	0,04±0,02 ^a	1,10±0,1 ^d	0,32±0,01 ^a
ME2B	577,80±4,2 ^a	49,24±0,1 ^c	247,93±13,48 ^{ab}	580,83±10,5 ^a	335,26±13,0 ^c	6,83±0,2 ^c	3,22±0,8 ^a	0,16±0,01 ^c	36,73±2,8 ^b	31,91±4,2 ^a	0,03±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	1,24±0,02 ^c	0,32±0,1 ^a
ME2C	583,93±4,8 ^a	48,67±2,9 ^c	236,33±3,9 ^b	552,82±3,9 ^b	349,26±6,8 ^c	6,94±0,1 ^c	3,53±0,2 ^a	0,13±0,04 ^c	33,52±4,2 ^{b,c}	30,81±1,4 ^a	0,05±0,02 ^a	0,05±0,02 ^a	1,21±0,04 ^c	0,30±0,1 ^a
NC2A	532,14±16,2 ^{cd}	60,36±1,7 ^a	213,51±4,9 ^c	468,22±5,7 ^{de}	344,44±7,3 ^c	6,86±0,1 ^c	3,33±0,8 ^a	0,30±0,03 ^a	31,74±1,6 ^c	14,74±8,5 ^c	0,04±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	1,44±0,04 ^a	0,26±0,1 ^a
NC2B	546,38±16,5 ^{b,c}	61,45±1,5 ^a	205,91±4,0 ^c	484,11±3,1 ^d	352,35±7,9 ^{b,c}	7,46±0,1 ^b	3,64±0,7 ^a	0,32±0,01 ^a	32,69±8,0 ^b	13,76±2,0 ^c	n.d.	0,05±0,02 ^a	1,42±0,1 ^a	0,30±0,1 ^a
NC2C	557,39±5,7 ^b	62,45±0,7 ^a	215,61±9,5 ^c	535,51±23,4 ^b	358,64±5,6 ^b	6,64±0,2 ^c	3,44±0,7 ^a	0,30±0,1 ^a	31,72±6,1 ^b	14,65±1,2 ^c	0,04±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	1,41±0,1 ^a	0,27±0,1 ^a
NN2A	563,49±13,4 ^{ab}	59,21±3,1 ^{ab}	266,42±1,9 ^a	501,21±3,3 ^c	385,33±12,2 ^a	7,28±0,2 ^b	3,89±0,1 ^a	0,33±0,01 ^a	31,13±7,2 ^b	12,44±3,9 ^c	n.d.	0,06±0,02 ^a	1,54±0,1 ^a	0,32±0,1 ^a
NN2B	590,61±21,9 ^a	58,51±2,8 ^{ab}	276,62±17,0 ^a	507,25±3,9 ^c	382,65±12,7 ^a	6,73±0,2 ^c	3,88±0,1 ^a	0,32±0,01 ^a	30,09±3,3 ^c	12,22±7,3 ^c	0,05±0,02 ^a	0,06±0,02 ^a	1,36±0,02 ^b	0,36±0,03 ^a
NN2C	520,16±3,7 ^d	60,31±2,2 ^a	272,43±15,2 ^a	494,15±9,4 ^{cd}	374,71±1,4 ^a	6,38±0,3 ^c	3,54±0,9 ^a	0,29±0,02 ^a	33,62±4,2 ^b	15,34±5,7 ^c	0,03±0,01 ^a	0,05±0,02 ^a	1,35±0,03 ^b	0,30±0,02 ^a
DM2A	478,16±4,4 ^f	43,31±0,5 ^d	152,34±3,3 ^f	365,44±7,1 ^e	350,25±8,4 ^{b,c}	8,28±0,8 ^a	3,64±4,2 ^a	0,21±0,02 ^b	46,5±2,8 ^a	27,13±2,9 ^{ab}	0,09±0,04 ^a	0,04±0,01 ^a	1,26±0,1 ^{b,c}	0,28±0,03 ^a
DM2B	521,65±7,3 ^d	43,84±0,2 ^d	206,64±3,5 ^c	458,94±5,6 ^e	342,27±6,3 ^c	8,59±0,2 ^a	3,51±0,2 ^a	0,22±0,01 ^b	41,83±4,4 ^{ab}	27,79±2,04 ^{ab}	0,10±0,06 ^a	0,04±0,01 ^a	1,13±0,1 ^d	0,28±0,03 ^a
DM2C	501,14±2,4 ^e	42,94±1,4 ^d	191,71±2,4 ^d	458,23±6,6 ^e	347,79±6,5 ^c	8,14±0,2 ^a	3,62±0,6 ^a	0,20±0,02 ^b	38,07±9,3 ^{ab}	30,78±3,7 ^a	0,06±0,03 ^a	0,05±0,02 ^a	1,27±0,02 ^c	0,28±0,04 ^a
DA2A	519,64±15,4 ^d	31,14±1,6 ^c	208,11±8,2 ^c	470,72±19,6 ^{de}	248,89±7,5 ^c	8,21±0,3 ^a	3,63±0,5 ^a	0,27±0,1 ^{ab}	28,75±3,6 ^c	27,49±6,1 ^{ab}	0,03±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a	0,91±0,1 ^c	0,29±0,1 ^a
DA2B	450,33±28,4 ^f	30,15±1,9 ^c	174,22±5,7 ^e	400,12±7,1 ^f	249,45±7,9 ^c	8,13±0,4 ^a	3,88±0,3 ^a	0,22±0,03 ^b	30,63±3,4 ^c	17,72±8,4 ^{b,c}	0,04±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a	0,98±0,02 ^c	0,28±0,04 ^a
DA2C	493,11±10,4 ^e	33,52±1,1 ^c	151,62±1,3 ^f	380,71±11,7 ^e	244,54±9,2 ^c	6,32±0,4 ^c	3,95±0,4 ^a	0,27±0,1 ^{ab}	29,37±4,1 ^c	29,86±1,5 ^a	0,04±0,02 ^a	0,04±0,01 ^a	1,02±0,1 ^{de}	0,28±0,03 ^a

Nota: As análises foram realizadas em quintuplicata e os dados são apresentados como média ± DP. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os diferentes lotes de FIs a um nível de significância ($p < 0,01$). n.d.: não definido (valor abaixo do limite de quantificação. LQ = 0,015 mg/100g).

Minerais como o Fe, Zn e Se apesar de serem metais nutricionalmente essenciais em níveis baixos, podem ser nocivos quando estão em níveis mais elevados em uma dieta. Após calcular a ingestão diária, observou-se que os valores obtidos para o Fe (40 mg/peso/dia) não ultrapassaram o limite tolerável em nenhuma das amostras. No entanto, o Zn e o Se estavam próximo do limite e/ou ultrapassaram o limite tolerável (Figura 28). As amostras ME1A (5,18 µg/peso/dia), NC1A (5,01 µg/peso/dia), NC1B (5,0 µg/peso/dia), NC1C (5,0 µg/peso/dia), NN1A (5,01 µg/peso/dia), NN1B (5,9 µg/peso/dia), NN1C (5,2 µg/peso/dia) das FIs de fase 1 e as amostras DM2A (7,2 µg/peso/dia) e os lotes DA2A (5,0 µg/peso/dia), DA2B (5,2 µg/peso/dia) e DA2C (5,4 µg/peso/dia) da marca DA2 das FIs de fase 2, ultrapassaram o limite tolerável diário para o Zn (5 mg/peso/dia); enquanto os lotes DM2A (120 µg/peso/dia), DM2B (181,4 µg/peso/dia) e DM2A (77,6 µg/peso/dia) da marca DM2 tiveram valores acima de 60 µg/peso/dia para o Se.

Figura 28 - Níveis de ingestão superior toleráveis (UL) para crianças de 0 a 12 meses e os valores de ingestão diária média calculado para as FIs de fase 1 e de fase 2 para o Fe, Zn e Se.



Nota: UL (nível de ingestão superior tolerável). < LQ (valores abaixo do limite de quantificação).

A tabela 25 apresenta os valores declarados no rótulo e os valores obtidos experimentalmente. Levando-se em consideração a tolerância de $\pm 20\%$ do valor declarado, de forma geral, todas as marcas tiveram pelo menos seis minerais com valores $\pm 20\%$ ao exposto nos seus respectivos rótulos. As marcas que tiveram maior número de inadequações foram NN1

(Ca, Mg, K, P, Fe, Zn, Cu, Se, I e Mn), DA1 (Mg, P, Fe, Cu, Se e Mn), ME2 (Ca, Na, K, P, Fe, Se e I e Mn) e NC2 (Ca, Na, K, P, Zn, Se, I e Mn).

Dentre os minerais avaliados, o Ca (ME1, NN1, ME2 e NC2), Mg (ME1, NN1, DA1 e DA2), Na (ME2 e NC2), K (ME1, NC1, NN1, ME2, NC2, DM2 e DA2), P (NN1, ME2, NC2 e DA2), Fe (NN1, ME2 e DM2), Zn (NC1, NN1, NC2, NN2, DM2 e DA2) e Cu (NN1, DA1 e NN2), I (todas as marcas) tiveram valores 20% a menos do que o declarado nos rótulos, enquanto o Ca (DM1 e NN2), Na (NC1), P (NC1, DM1, DA1 e NN2), Fe (DA1), Se (todas as marcas) e Mn (todas as marcas) tiveram valores 20% a mais do que o declarado nos rótulos. Os valores de Cr, Mo e Co não tiveram seus valores descritos no rótulo, por isto, não foi possível compará-los com os resultados obtidos.

Quando confrontado com os valores mínimos e máximos descritos na RDC n°43/2011 e RDC n°44/2011, constatou-se que após converter os valores para 100 kcal, apenas os minerais Se (DM2) e I (ME1, NC2, NN1, NN2 e DA2), não cumpriram com as recomendações vigentes. A marca DM2 (20,43 µg/100kcal) obteve um valor experimental de 126% a mais do que o valor máximo permitido para o Se (10 µg/100kcal). Enquanto as marcas ME1 (7,38 µg/100kcal), NC2 (7,91 µg/100kcal), NN1 (8,10 µg/100kcal), NN2 (9,82 µg/100kcal) e DA2 (6,04 µg/100kcal) obtiveram valores abaixo do limite mínimo estabelecido (10 µg/100kcal).

Tabela 25 - Concentrações dos minerais estudados em 100kcal das FIs de fase 1 e fase 2, e os valores referente as informações do rótulo

Fórmulas Infantis de Fase 1													
Minerais	Unid.	ME1		NC1		NN1		DM1		DA1			
		IR	CM	IR	CM	IR	CM	IR	CM	IR	CM		
Ca	mg/100kcal	92	73,4*	63,4	71,1	110,7	81,6*	79,1	107,3**	94	103,6		
Mg	mg/100kcal	12,1	9,6*	11,7	11,6	11,9	6,5*	11,6	12,1	12,2	8,9*		
Na	mg/100kcal	30	29,4	25,7	35,7**	33,2	29,6	37,4	41,7	35,7	37,9		
K	mg/100kcal	104	81,7*	95	75,2*	116,7	73,3*	96,9	97,6	99,4	88,3		
P	mg/100kcal	53	60,9	33,7	47,6**	62,4	48,5*	49,6	69,3**	57,2	71,6**		
Fe	mg/100kcal	1	1,07	1,1	1,09	1,6	1,22*	1,2	1,37	1,3	1,72**		
Zn	mg/100kcal	0,72	0,69	1,1	0,85*	1,2	0,62*	0,8	0,69	0,9	0,88		
Cu	µg/100kcal	63	53,85	79,2	72,87	72,4	54,48*	63	61,38	67,8	44,32*		
Cr	mg/100kcal	n.d.	5,82	n.d.	4,77	n.d.	4,55	n.d.	6,31	n.d.	8,71		
Mo	µg/100kcal	n.d.	7318,2	n.d.	2003,4	n.d.	2251,9	n.d.	1291,1	n.d.	5903,6		
Se	µg/100kcal	1,5	4,09**	2,8	7,27**	2,8	8,11**	2,2	7,93**	3,5	6,82**		
I	µg/100kcal	16	7,4**	23,8	12,3*	24,1	8,1*	15,2	10,0*	22,1	9,9*		
Co	µg/100kcal	n.d.	192,0	n.d.	179,9	n.d.	167,7	n.d.	280,6	n.d.	253,6		
Mn	µg/100kcal	13	99,3**	21,8	75,1**	22,1	65,5**	9,8	55,0**	17,8	59,3**		

Fórmulas Infantis de Fase 2													
Minerais	Unid	ME2		NC2		NN2		DM2		DA2			
		IR	CM	IR	CM	IR	CM	IR	CM	IR	CM		
Ca	mg/100kcal	118	51,4*	120,0	80,9*	80,5	117,8**	114,7	115,5	120,1	106,7		
Mg	mg/100kcal	12	11,7	n.d.	8,2	12,5	10,2	12,2	12,3	12,9	6,9*		
Na	mg/100kcal	45	24,1*	44,3	29,9*	50,8	47,7	49,7	56,3	40,7	39,0		
K	mg/100kcal	152	67,2*	126,6	70,0*	132,4	112,8	133,1	103,7*	130,4	91,3*		
P	mg/100kcal	64	37,8*	69,6	54,1*	44,5	71,2**	70,4	78,9	70	54,9*		
Fe	mg/100kcal	1,6	1,12*	1,6	1,31	1,2	1,42	1,8	1,40*	1,8	1,66		
Zn	mg/100kcal	0,8	0,83	1,1	0,62*	1,2	0,63*	1,0	0,77*	1,1	0,83*		
Cu	µg/100kcal	75	72,39	75,9	65,54	84,7	38,60*	64,2	65,30	67,4	56,31		
Cr	mg/100kcal	n.d.	5,12	n.d.	4,98	n.d.	6,84	n.d.	6,39	n.d.	6,47		
Mo	µg/100kcal	n.d.	1870,0	n.d.	5149,1	n.d.	5834,0	n.d.	2761,5	n.d.	5476,8		
Se	µg/100kcal	2,3	6,36**	2,0	8,90**	2,3	5,57**	2,9	20,43**	2,8	8,65**		
I	µg/100kcal	20	11,2*	27,4	7,9*	31,8	9,8*	1,8	14,2**	18,6	6,0*		
Co	µg/100kcal	n.d.	149,8	n.d.	162,7	n.d.	237,5	n.d.	297,2	n.d.	212,9		
Mn	µg/100kcal	15	68,0**	9,5	64,9**	12,7	67,1**	11,4	68,8**	13,3	62,6**		

Nota: As análises foram realizadas em quintuplicata e os dados são apresentados como média. Valores seguidos de “*” indicam que estavam abaixo de 20% e os valores seguidos por “**” indicam que estavam acima de 20%. CM, concentrações dos minerais, FIs, fórmulas infantis, IR, informação do rótulo, Unid., unidade.

4.5.3 Avaliação do potencial risco da presença de metais tóxicos nas FIs

As concentrações da maioria dos minerais apresentaram valores abaixo do limite de quantificação, não sendo possível obter os resultados para todos os metais (Tabela 26). Dentre os metais analisados, o Al foi o metal que apresentou maior concentração, variando de 0,220 a 1,293 $\mu\text{g/g}$, enquanto o Cd e o U foram os metais com menor concentração. O Hg foi o único metal que foi quantificado em apenas uma das amostras de FIs (NC1C = 0,0129 $\mu\text{g/g}$), estando a maioria das marcas abaixo do LQ ($< 0,0108$).

Tabela 26 - Concentração dos metais tóxicos nas FIs de fase 1 e fase 2 e o limite de quantificação daqueles no qual não foi possível quantificar

	Metais tóxicos ($\mu\text{g/g}$)						
	Hg	As	Cd	Pb	Al	Sn	U
FIs de fase 1							
ME1A	< 0,0108	0,0133	< 0,0018	< 0,0103	0,5614	0,0070	0,0024
ME1B	< 0,0108	0,0206	0,0020	< 0,0103	0,8056	0,0132	0,0062
ME1C	< 0,0108	0,0150	0,0028	< 0,0103	0,8059	< 0,0051	0,0056
NC1A	< 0,0108	< 0,0109	0,0039	< 0,0103	< 0,4301	0,0762	< 0,0012
NC1B	< 0,0108	0,0138	0,0065	< 0,0103	< 0,4301	0,1046	< 0,0012
NC1C	0,0129	< 0,0109	0,0040	< 0,0103	1,0082	0,0613	< 0,0012
NN1A	< 0,0108	< 0,0109	0,0022	< 0,0103	< 0,4301	0,0329	< 0,0012
NN1B	< 0,0108	< 0,0109	0,0065	0,0362	0,6020	0,1010	< 0,0012
NN1C	< 0,0108	0,0112	0,0027	< 0,0103	0,4806	0,0285	< 0,0012
DM1A	< 0,0108	0,0278	0,0035	< 0,0103	< 0,4301	0,0510	0,0086
DM1B	< 0,0108	0,0316	0,0062	0,0160	0,4412	0,0926	0,0081
DM1C	< 0,0108	0,0332	0,0049	< 0,0103	0,4759	0,0617	0,0092
DA1A	< 0,0108	0,0283	0,0052	< 0,0103	0,9042	0,0300	0,0100
DA1B	< 0,0108	0,0227	0,0066	< 0,0103	< 0,4301	0,0386	0,0105
DA1C	< 0,0108	< 0,0109	0,0029	< 0,0103	1,0305	0,0522	0,0124
FIs de fase 2							
ME2A	< 0,0108	0,0219	< 0,0018	< 0,0103	0,9157	< 0,0051	0,0078
ME2B	< 0,0108	0,0247	< 0,0018	0,0233	0,5074	< 0,0051	0,0066
ME2C	< 0,0108	0,0151	0,0020	< 0,0103	0,5958	0,0233	0,0053
NC2A	< 0,0108	< 0,0109	0,0074	0,0111	0,7423	0,0730	0,0020
NC2B	< 0,0108	0,0121	0,0096	< 0,0103	1,1424	0,1202	0,0043
NC2C	< 0,0108	0,0143	0,0078	< 0,0103	0,9422	0,0928	0,0026
NN2A	< 0,0108	0,0144	0,0033	< 0,0103	0,5696	0,0586	0,0017
NN2B	< 0,0108	0,0137	0,0056	< 0,0103	0,5780	0,0984	0,0017
NN2C	< 0,0108	0,0182	0,0036	< 0,0103	< 0,4301	0,0682	0,0014
DM2A	< 0,0108	0,0390	0,0048	< 0,0103	0,4340	0,0457	0,0088
DM2B	< 0,0108	0,0322	0,0040	< 0,0103	< 0,4301	0,0296	0,0110
DM2C	< 0,0108	0,0323	0,0039	< 0,0103	< 0,4301	0,0237	0,0077
DA2A	< 0,0108	0,0218	0,0045	< 0,0103	1,2939	0,0370	0,0202
DA2B	< 0,0108	0,0261	0,0036	< 0,0103	1,1112	0,0323	0,0077
DA2C	< 0,0108	0,0230	0,0043	< 0,0103	1,3164	0,0353	0,0195

A tabela 27 faz um comparativo entre a média das marcas de FIs de fase 1 e das marcas de FIs de fase 2. Em relação às concentrações dos metais nas amostras em que foi possível obter os resultados, observou-se através desta análise estatística, que ao comparar as FIs de fase 1 e as de fase 2, não foi encontrado diferença entre os metais As, Cd, Pb e U. As concentrações médias determinadas variaram de $0,008 \pm 0,003 \mu\text{g/g}$ a $0,038 \pm 0,009 \mu\text{g/g}$, $0,004 \pm 0,001 \mu\text{g/g}$ a $0,007 \pm 0,00 \mu\text{g/g}$, $0,003 \pm 0,001 \mu\text{g/g}$ a $0,005 \pm 0,001 \mu\text{g/g}$, $0,003 \pm 0,001 \mu\text{g/g}$ a $0,010 \pm 0,005 \mu\text{g/g}$, respectivamente. Já os metais Al ($0,220 \pm 0,003$ a $1,293 \pm 0,046 \mu\text{g/g}$) e Sn ($0,007 \pm 0,003$ a $0,073 \pm 0,020 \mu\text{g/g}$) tiveram uma maior heterogeneidade entre as formulações ($p < 0,01$).

Tabela 27 - Concentrações de metais tóxicos nas FIs de fase 1 e de fase 2

FIs	Metais tóxicos ($\mu\text{g/g}$)						
	Hg	As	Cd	Pb	Al	Sn	U
ME1	n.d.	$0,013 \pm 0,005^a$	$0,006 \pm 0,001^a$	$0,003 \pm 0,001^a$	$0,561 \pm 0,108^c$	$0,007 \pm 0,003^b$	$0,003 \pm 0,001^a$
ME2	n.d.	$0,021 \pm 0,003^a$	$0,004 \pm 0,001^a$	$0,003 \pm 0,001^a$	n.d.	$0,005 \pm 0,001^b$	$0,008 \pm 0,003^a$
NC1	n.d.	$0,009 \pm 0,003^a$	n.d.	n.d.	$0,220 \pm 0,003^d$	n.d.	$0,003 \pm 0,001^a$
NC2	n.d.	$0,010 \pm 0,004^a$	$0,007 \pm 0,003^a$	n.d.	$0,742 \pm 0,048^b$	$0,073 \pm 0,020^a$	$0,004 \pm 0,001^a$
NN1	n.d.	$0,008 \pm 0,003^a$	n.d.	$0,005 \pm 0,001^a$	$0,428 \pm 0,051^c$	n.d.	$0,004 \pm 0,001^a$
NN2	n.d.	$0,014 \pm 0,003^a$	$0,005 \pm 0,001^a$	n.d.	$0,569 \pm 0,107^c$	$0,058 \pm 0,009^a$	$0,003 \pm 0,001^a$
DM1	n.d.	$0,030 \pm 0,007^a$	n.d.	$0,003 \pm 0,001^a$	$0,400 \pm 0,077^c$	$0,051 \pm 0,032^a$	$0,009 \pm 0,002^a$
DM2	n.d.	$0,038 \pm 0,009^a$	$0,004 \pm 0,002^a$	n.d.	$0,434 \pm 0,058^c$	$0,045 \pm 0,017^a$	$0,009 \pm 0,001^a$
DA1	n.d.	$0,030 \pm 0,005^a$	n.d.	n.d.	n.d.	$0,030 \pm 0,021^a$	$0,010 \pm 0,005^a$
DA2	n.d.	$0,021 \pm 0,004^a$	$0,004 \pm 0,001^a$	n.d.	$1,293 \pm 0,046^a$	$0,037 \pm 0,025^a$	$0,009 \pm 0,002^a$

Nota: As análises foram realizadas em quintuplicata e os dados são apresentados como média \pm DP. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os FIs em um nível de significância $p < 0,01$. As amostras que ficaram abaixo do limite de quantificação não foram consideradas na estatística. FIs, fórmulas infantis. Hg, mercúrio. As, arsênio. Cd, cádmio. Pb, chumbo. Al, alumínio. Sn, estanho. U, urânio. n.d.: não definido (abaixo do limite de quantificação). Hg (LQ = 0,0108), Cd (LQ = 0,0018), Pb (LQ = 0,0018), Al (LQ = 0,4301), Sn (LQ = 0,0051) e U (LQ = 0,0012).

A tabela 28 faz um comparativo entre os lotes das marcas de FIs de fase 1 e das marcas de FIs de fase 2. Em relação à análise estatística dos diferentes lotes, de forma geral, não foi encontrado variação entre os metais As, Cd, Pb e U. As variações entre as formulações ($p < 0,01$) foram observadas apenas para os metais Al e Sn, assim como observado entre as FIs de fase 1 e fase 2. Em relação ao Al, as amostras NC1C ($1,008 \pm 0,025 \mu\text{g/g}$), DA1C ($1,030 \pm 0,026 \mu\text{g/g}$) e os três lotes da marca DA2 ($1,293 \pm 0,046$, $1,211 \pm 0,059$ e $1,316 \pm 0,062 \mu\text{g/g}$), foram os que apresentaram maior concentração, enquanto as amostras ME2B ($0,527 \pm 0,031 \mu\text{g/g}$), ME2C

(0,596±0,060 µg/g), NN2A (0,569±0,077 µg/g) e NN2B (0,578±0,081 µg/g) foram as que tiveram a menor concentração de Al dentre as outras marcas.

Tabela 28 - Concentrações de metais potencialmente tóxicos dos lotes de FIs de fase 1 e FIs de fase 2

FIs	Metais tóxicos (µg/g)						
	Hg	As	Cd	Pb	Al	Sn	U
Fórmulas Infantis de Fase 1							
ME1A	n.d.	0,013±0,005 ^a	n.d.	n.d.	0,561±0,048 ^c	0,007±0,002 ^c	0,007±0,003 ^a
ME1B	n.d.	0,021±0,008 ^a	0,002±0,001 ^a	n.d.	0,880±0,017 ^b	0,013±0,001 ^c	0,006±0,002 ^a
ME1C	n.d.	0,015±0,006 ^a	0,003±0,001 ^a	n.d.	0,826±0,080 ^b	n.d.	0,005±0,002 ^a
NC1A	n.d.	n.d.	0,005±0,001 ^a	n.d.	n.d.	0,076±0,012 ^a	n.d.
NC1B	n.d.	0,014±0,004 ^a	0,006±0,001 ^a	n.d.	n.d.	0,104±0,035 ^a	n.d.
NC1C	0,0129±0,01	n.d.	0,005±0,001 ^a	n.d.	1,008±0,025 ^a	0,061±0,026 ^{a,b}	n.d.
NN1A	n.d.	n.d.	0,006±0,001 ^a	n.d.	n.d.	0,033±0,013 ^b	n.d.
NN1B	n.d.	n.d.	0,006±0,003 ^a	0,036±0,014 ^a	0,602±0,038 ^c	0,101±0,025 ^a	n.d.
NN1C	n.d.	0,011±0,007 ^a	0,003±0,001 ^a	n.d.	0,481±0,024 ^d	0,038±0,006 ^b	n.d.
DM1A	n.d.	0,028±0,014 ^a	0,003±0,001 ^a	n.d.	n.d.	0,051±0,033 ^{a,b}	0,008±0,004 ^a
DM1B	n.d.	0,031±0,017 ^a	0,006±0,002 ^a	0,016±0,012 ^a	0,441±0,056 ^d	0,092±0,046 ^{a,b}	0,008±0,004 ^a
DM1C	n.d.	0,033±0,014 ^a	0,005±0,001 ^a	n.d.	0,476±0,015 ^d	0,061±0,020 ^{a,b}	0,009±0,006 ^a
DA1A	n.d.	0,028±0,011 ^a	0,005±0,001 ^a	n.d.	0,904±0,010 ^b	0,049±0,021 ^{a,b}	0,010±0,007 ^a
DA1B	n.d.	0,022±0,013 ^a	0,006±0,001 ^a	n.d.	n.d.	0,059±0,022 ^{a,b}	0,015±0,009 ^a
DA1C	n.d.	n.d.	0,003±0,001 ^a	n.d.	1,030±0,026 ^a	0,052±0,026 ^{a,b}	0,012±0,008 ^a
Fórmulas Infantis de Fase 2							
ME2A	n.d.	0,022±0,011 ^a	n.d.	n.d.	0,915±0,047 ^c	n.d.	0,008±0,003 ^a
ME2B	n.d.	0,024±0,015 ^a	n.d.	0,023±0,013 ^a	0,527±0,031 ^e	n.d.	0,006±0,004 ^a
ME2C	n.d.	0,015±0,009 ^a	0,002±0,001 ^a	n.d.	0,596±0,060 ^e	0,023±0,011 ^d	0,008±0,002 ^a
NC2A	n.d.	n.d.	0,007±0,003 ^a	0,011±0,01 ^a	0,742±0,058 ^d	0,083±0,039 ^{a,b}	0,005±0,003 ^a
NC2B	n.d.	0,012±0,007 ^a	0,010±0,004 ^a	n.d.	1,142±0,021 ^b	0,120±0,015 ^a	0,005±0,003 ^a
NC2C	n.d.	0,014±0,008 ^a	0,008±0,004 ^a	n.d.	0,942±0,035 ^c	0,093±0,034 ^{a,b}	0,006±0,003 ^a
NN2A	n.d.	0,014±0,005 ^a	0,004±0,002 ^a	n.d.	0,569±0,077 ^e	0,081±0,025 ^{a,b}	0,006±0,003 ^a
NN2B	n.d.	0,013±0,009 ^a	0,005±0,003 ^a	n.d.	0,578±0,081 ^e	0,098±0,033 ^{a,b}	0,007±0,005 ^a
NN2C	n.d.	0,018±0,011 ^a	0,004±0,002 ^a	n.d.	n.d.	0,068±0,014 ^{b,c}	0,005±0,004 ^a
DM2A	n.d.	0,038±0,014 ^a	0,005±0,002 ^a	n.d.	0,434±0,056 ^d	0,045±0,017 ^{b,c,d}	0,008±0,003
DM2B	n.d.	0,032±0,012 ^a	0,004±0,003 ^a	n.d.	n.d.	0,029±0,011 ^d	0,011±0,006 ^a
DM2C	n.d.	0,032±0,019 ^a	0,006±0,003 ^a	n.d.	n.d.	0,023±0,012 ^d	0,007±0,004 ^a
DA2A	n.d.	0,022±0,013 ^a	0,004±0,002 ^a	n.d.	1,293±0,046 ^a	0,037±0,019 ^{c,d}	0,020±0,012 ^a
DA2B	n.d.	0,026±0,012 ^a	0,005±0,003 ^a	n.d.	1,211±0,059 ^a	0,032±0,024 ^{c,d}	0,008±0,004 ^a
DA2C	n.d.	0,023±0,013 ^a	0,004±0,003 ^a	n.d.	1,316±0,062 ^a	0,035±0,023 ^{c,d}	0,020±0,014 ^a

Nota: As análises foram realizadas em quintuplicata e os dados são apresentados como média ± DP. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os FIs em um nível de significância $p < 0,01$. As amostras que ficaram abaixo do limite de quantificação não foram consideradas na estatística. FIs, fórmulas infantis. Hg, mercúrio. As, arsênio. Cd, cádmio. Pb, chumbo. Al, alumínio. Sn, estanho. U, urânio. n.d., não determinado devido a concentração abaixo do limite de detecção. Hg (LQ = 0,0108), Cd (LQ = 0,0018), Pb (LQ = 0,0018), Al (LQ = 0,4301), Sn (LQ = 0,0051) e U (LQ = 0,0012).

A tabela 29 apresenta a avaliação do quociente de risco (QR) de exposição a metais tóxicos nos três lotes de FIs de fase 1 e de fase 2. Os resultados da avaliação de risco para as FIs de fase 1 variaram de 0,05 µg/g/peso/dia (DA1C) a 1,32 µg/g/peso/dia (DA1A) para o As (Rfd = 2,1 µg/g/peso/dia); 0,04 µg/g/peso/dia (ME1B, NN1A) a 0,19 µg/g/peso/dia (NC1B) para o Cd (Rfd = 1,0 µg/g/peso/dia); 0,18 µg/g/peso/dia (DM1B) a 0,44 µg/g/peso/dia (NN1B) para o Pb (Rfd = 1,5 µg/g/peso/dia); 1,79 µg/g/peso/dia (NN1A) a 5,65 µg/g/peso/dia (DA1A) para o Al (Rfd = 5 µg/g/peso/dia); 0,29 µg/g/peso/dia (ME1A) a 6,8 µg/g/peso/dia (NN1B) para o Sn (Rfd = 0,3 µg/g/peso/dia); 0,35 µg/g/peso/dia (ME1C) a 0,78 µg/g/peso/dia (DA1C) para o U (Rfd = 0,3 µg/g/peso/dia). O Hg foi o único metal no qual a maioria das formulações não teve sua concentração detectada na análise, não sendo possível calcular o QR. No entanto, a única amostra em que houve a identificação do Hg foi o NC1C que obteve um resultado de 0,1 µg/g/peso/dia (Rfd = 4 µg/g/peso/dia).

Em relação aos resultados da avaliação de risco para as FIs de fase 2, os mesmos variaram de 0,07 µg/g/peso/dia (NN2A, NN2B) a 0,25 µg/g/peso/dia (DM2A) para o As (Rfd = 2,1 µg/g/peso/dia); 0,03 µg/g/peso/dia (ME2C, NN2A, NN2C) a 0,14 µg/g/peso/dia (NC2B) para o Cd (Rfd = 1,0 µg/g/peso/dia); 0,23 µg/g/peso/dia (ME2B) a 0,31 µg/g/peso/dia (NC2A) para o Pb (Rfd = 1,5 µg/g/peso/dia); 1,32 µg/g/peso/dia (DM2A) a 3,91 µg/g/peso/dia (DA2C) para o Al (Rfd = 5 µg/g/peso/dia); 1,09 µg/g/peso/dia (DM2C) a 5,71 µg/g/peso/dia (NC2B) para o Sn (Rfd = 0,3 µg/g/peso/dia); 0,05 µg/g/peso/dia (NN2C) a 1,0 µg/g/peso/dia (DA2B) para o U (Rfd = 0,3 µg/g/peso/dia).

Ao comparar os valores calculados dos QRs para os metais entre os lotes, observou-se uma diferença estatística ($p < 0,01$), tanto entre os lotes das FIs de fase 1, quanto entre os lotes das FIs de fase 2.

Tabela 29 - Quociente de risco de exposição a metais tóxicos nos lotes de FIs de fase 1 e nos lotes de FIs de fase 2 destinados a crianças de 7 a 12 meses

FIs	Quociente de risco µg/g/peso/dia						
	Hg	As	Cd	Pb	Al	Sn	U
FIs de fase 1							
ME1A	n.d.	0,08±0,07 ^{d,e}	n.d.	n.d.	2,13±2,30 ^b	0,29±0,41 ^d	0,15±0,01 ^d
ME1B	n.d.	0,19±0,07 ^{b,c,d}	0,04±0,01 ^b	n.d.	3,06±0,79 ^a	0,83±0,27 ^d	0,39±0,09 ^c
ME1C	n.d.	0,13±0,01 ^d	0,06±0,01 ^b	n.d.	3,06±3,82 ^a	n.d.	0,35±0,02 ^c
NC1A	n.d.	n.d.	0,08±0,03 ^a	n.d.	n.d.	5,06±0,10 ^a	n.d.
NC1B	n.d.	0,13±0,01 ^d	0,19±0,08 ^a	n.d.	n.d.	6,95±2,33 ^a	n.d.

Continua

Continuação

NC1C	0,1±0,01	n.d.	0,08±0,04^a	n.d.	4,02±15,74^a	4,07±1,37^{a,b}	n.d.
NN1A	n.d.	n.d.	0,04±0,01 ^b	n.d.	1,79±5,81	2,22±0,91 ^b	n.d.
NN1B	n.d.	n.d.	0,13±0,05 ^a	0,44±0,06 ^a	2,43±5,91 ^a	6,80±2,66 ^a	n.d.
NN1C	n.d.	0,06±0,04 ^c	0,05±0,02 ^b	n.d.	1,94±2,71 ^b	1,92±0,72 ^c	n.d.
DM1A	n.d.	0,24±0,03^{b,c}	0,06±0,02^b	n.d.	n.d.	3,07±1,99^{a,b}	0,52±0,08^{b,c}
DM1B	n.d.	0,27±0,01 ^b	0,11±0,05 ^a	0,18±0,02 ^b	1,84±6,28 ^c	5,58±3,59 ^{a,b}	0,49±0,09 ^{b,c}
DM1C	n.d.	0,28±0,03 ^b	0,09±0,03 ^a	n.d.	2,12±6,77 ^c	3,71±2,01 ^{a,b}	0,55±0,08 ^{b,c}
DA1A	n.d.	1,32±0,91 ^a	0,10±0,08 ^a	n.d.	5,65±8,99 ^a	1,90±0,79 ^c	0,63±0,06 ^{a,b}
DA1B	n.d.	0,19±0,02 ^c	0,13±0,02 ^a	n.d.	n.d.	2,44±0,32 ^c	0,66±0,07 ^{a,b}
DA1C	n.d.	0,05±0,02 ^e	0,05±0,03 ^b	n.d.	3,91±7,31 ^a	3,31±0,36 ^b	0,78±0,09 ^a
FIs de fase 2							
ME2A	n.d.	0,15±0,06 ^{a,b}	n.d.	n.d.	2,72±6,74 ^a	n.d.	0,38±0,04 ^c
ME2B	n.d.	0,17±0,03 ^{a,b}	0,04±0,01 ^b	0,23±0,05 ^a	1,51±7,76 ^{b,c}	n.d.	0,32±0,02 ^c
ME2C	n.d.	0,11±0,04 ^{b,c}	0,03±0,01 ^b	n.d.	1,77±4,22 ^{b,c}	1,15±0,71 ^c	0,25±0,09 ^{c,d}
NC2A	n.d.	n.d.	0,11±0,01 ^a	0,31±0,06 ^a	2,20±2,08 ^b	3,46±0,71 ^a	0,09±0,04 ^e
NC2B	n.d.	0,08±0,02 ^c	0,14±0,02 ^a	n.d.	3,39±7,50 ^a	5,71±1,77 ^a	0,20±0,04 ^d
NC2C	n.d.	0,09±0,02 ^c	0,11±0,03 ^a	n.d.	2,80±12,59 ^{a,b}	4,40±1,14 ^a	0,12±0,07 ^e
NN2A	n.d.	0,07±0,01 ^c	0,03±0,01 ^b	n.d.	1,69±2,88 ^c	2,08±0,19 ^b	0,06±0,01 ^e
NN2B	n.d.	0,07±0,02 ^c	0,06±0,02 ^b	n.d.	1,72±2,17 ^c	3,50±1,17 ^{a,b}	0,06±0,01 ^e
NN2C	n.d.	0,09±0,01 ^c	0,03±0,01 ^b	n.d.	n.d.	2,42±0,31 ^b	0,05±0,01 ^e
DM2A	n.d.	0,25±0,05 ^a	0,06±0,03 ^b	n.d.	1,32±2,11 ^d	2,11±0,79 ^b	0,41±0,04 ^b
DM2B	n.d.	0,21±0,01 ^a	0,05±0,07 ^a	n.d.	n.d.	1,37±0,51 ^c	0,51±0,07 ^b
DM2C	n.d.	0,21±0,01 ^a	0,05±0,01 ^b	n.d.	n.d.	1,09±0,76 ^c	0,36±0,03 ^c
DA2A	n.d.	0,15±0,06 ^{a,b}	0,07±0,01 ^b	n.d.	3,84±4,72 ^a	1,83±0,31 ^c	1,00±0,09 ^a
DA2B	n.d.	0,18±0,04 ^{a,b}	0,05±0,02 ^b	n.d.	3,30±6,34 ^a	1,60±0,19 ^c	0,38±0,05 ^c
DA2C	n.d.	0,16±0,06 ^{a,b}	0,06±0,01 ^b	n.d.	3,91±7,19 ^a	1,74±0,58 ^c	0,97±0,11 ^a

Nota: As análises foram realizadas em duplicata e os dados são relatados como média ± DP. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os três lotes de FIs de fase 1, e entre os três lotes de FIs de fase 2 em um nível de significância $p < 0,01$. n.d., não determinado devido a concentração abaixo do limite de detecção. Hg (LQ = 0,0108), Cd (LQ = 0,0018), Pb (LQ = 0,0018), Al (LQ = 0,4301), Sn (LQ = 0,0051) e U (LQ = 0,0012).

4.6 Conformidade da rotulagem

Nenhuma das marcas de FIs analisadas conseguiu 100% de conformidade, quando considerados todos os quesitos que compunham o *check-list* (Tabela 30). Os maiores percentuais de conformidades foram encontrados nas formulações ME1 (99%) e ME2 (97%). O grupo que registrou a maior média de itens não conformes ($\leq 50\%$) foi o grupo 1, que diz respeito a designação do produto. Apesar de todas as marcas designarem corretamente a que se pretendia o produto, apenas as marcas ME1 e ME2 especificaram claramente que a proteína utilizada era proveniente do LV.

Tabela 30 - Percentual de conformidades das rotulagens

FIs	Designação do produto (Grupo 1)	Características essenciais de composição e qualidade (Grupo 2)	Rotulagem (Grupo 3)	Adequações (Grupo 4)
ME1	100%	96%	100%	99%
ME2	100%	96%	94%	97%
NC1	50%	96%	88%	78%
NC2	50%	96%	83%	76%
NN1	50%	93%	88%	77%
NN2	50%	95%	83%	76%
DM1	50%	95%	94%	80%
DM2	50%	95%	89%	78%
DA1	50%	94%	88%	77%
DA2	50%	94%	83%	76%

Em relação ao grupo 2, todas as formulações, exceto a ME1 e a ME2, não especificaram no rótulo as quantidades de nutrientes em 100 kcal ou 100 kJ. Apesar de ser uma informação opcional (RDCs 43/2011 e 44/2011 - Art. 35, parágrafo 1º), é uma informação importante quando se deseja confrontar com o valor recomendado nas RDCs, que estão em 100 kcal. Logo, para que fosse possível realizar a avaliação dos conteúdos nutricionais e correlacionar com as RDCs, foi necessário realizar a conversão dos valores expressos no rótulo para a unidade usual e utilizada pela legislação (100 kcal). No que se refere aos valores de macronutrientes e micronutrientes apresentados como informação nutricional nos rótulos das amostras, observa-se que de modo geral estes valores se encontram dentro dos limites mínimos e máximos estabelecidos pela RDC 43/2011 e RDC 44/2011 (APÊNDICE C, APÊNDICE D, APÊNDICE E), estando apenas não conforme o teor de Fe (1,6 mg/100kcal) na amostra NN1, no qual o limite não poderia ultrapassar 1,3 mg/100kcal e o conteúdo de ARA das amostras ME1 (34 mg/100 kcal de ARA e 17 mg/100kcal de DHA), ME2 (34 mg/100kcal de ARA e 17 mg/100kcal de DHA), DA1 (9,7 mg/100kcal de ARA e 9,9 mg/100kcal de DHA) e DA2 (10,5 mg/100kcal de ARA e 9,4 mg/100kcal de DHA) que não apresentaram concentrações iguais a de DHA, como especificado no item 17. Além disso, observou-se que as marcas DM1 e DM2, do mesmo fabricante, não especificaram em seus rótulos os valores para o ácido linoléico e α -ácido linoléico e mio-Inositol, o que sugere que não foram adicionados. Ademais, não houve adição de nenhum dos ingredientes opcionais, exceto a adição de taurina (6,9 mg/100kcal) na amostra DM2.

O item 15.2 do grupo 2, que se refere a relação entre a vitamina E com os ácidos graxos poliinsaturados, não foi determinado, uma vez que esta informação não estava claramente descrita nos rótulos.

O grupo 3 avaliou as informações a respeito da rotulagem das FIs para lactente e de seguimento para lactentes, sendo composta por 20 itens. Esse grupo apresentou um percentual médio de inadequação de 14%. Os itens nos quais foram identificadas uma maior quantidade de FIs apresentando não conformidades foram os itens 2 (NC1, NC2, NN1, NN2, DM1, DM2, DA1 e DA2), referente a unidade declarada a informação nutricional por 100 kcal ou por 100 kJ, e o item 8 (NC1, NC2, NN1, NN2, DM1, DM2, DA1 e DA2), que versa sobre a exposição de forma clara ao consumidor das fontes de proteína do produto. Embora esses itens já tenham sido citados nos grupos 1 e 2, que se referem aos capítulos II e III da RDC 43/2011 e RDC 44/2011, estes também são citados no capítulo V, por isto as informações se encontram duplicadas. Os itens 4 e 18 do grupo 3, que dizem respeito a presença de probióticos na composição das FIs, não se aplicaram a nenhuma das fórmulas analisadas. Em relação ao item 20, que se refere apenas as FIs de seguimento para lactentes (“O Ministério da Saúde informa: após os 6 (seis) meses de idade continue amamentando seu filho e ofereça novos alimentos”), nenhuma das FIs de fase 2, expuseram esta advertência em seus rótulos.

5 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da qualidade proteica das FIs

As FIs são um produto à base de LV ou de outros animais ou de uma mistura destes e/ou outros ingredientes comprovadamente adequados para a alimentação infantil (WHO/FAO/UNU, 2007). O LH e o LV diferem não apenas na composição de seus nutrientes, mas também na sua qualidade. Uma das principais diferenças entre a composição do LM e do LV é o conteúdo de proteínas, aspecto este, fundamental a ser considerado quando utiliza-se o LV para o consumo infantil. O LM contém cerca de 0,8 – 1,3 g/100mL de proteína, que varia com o estágio da lactação, enquanto o LV integral contém em torno de 3,3 g/100mL, quase o triplo da quantidade presente no LM (DUPONT, 2003; PRENTICE et al., 2016; RÊGO et al., 2018; DONOVAN et al., 2019). Avanços técnicos na química das proteínas do leite geraram uma série de soluções para corrigir este “problema” nas FIs à base de LV. Neste estudo, ao comparar o conteúdo total de proteínas presentes nas FIs de fase 1 e FIs de fase 2 frente à amostra de LV integral, confirmou-se que o conteúdo total de proteína do LV foi maior quando comparado às FIs, o que demonstra que houve um esforço para diminuir a alta concentração de proteínas afim de igualar ao observado no LM.

De acordo com a legislação brasileira (RDC n°43/2011 e RDC n°44/2011) as FIs para lactentes (fase 1) à base de proteínas do LV não hidrolisadas, o conteúdo mínimo deve ser de 1,8 g/100 kcal e o máximo de 3,0 g/100 kcal, enquanto para as FIs de seguimento (fase 2) para lactentes à base de proteína do LV não hidrolisada, o conteúdo mínimo deve ser 1,8 g/100 kcal e o máximo 3,5 g/100 kcal (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b). Levando-se em consideração as informações expressas no rótulo das FIs (g/100 Kcal), os valores para o conteúdo de proteínas de todas as marcas estavam de acordo com a legislação brasileira. Entretanto, os valores obtidos experimentalmente (g/100 Kcal) constataram que as FIs para lactentes ME1C, DM1A e DM1B estavam acima dos limites estabelecidos recomendados, e nenhum deles estavam abaixo do valor mínimo estabelecido pela legislação brasileira. Resultado diferente foi observado por Nunes et al. (2017), onde dentre as seis amostras de FIs avaliadas e que são comercializadas na cidade de Viçosa-MG, os autores encontraram três amostras do mesmo fabricante com valores abaixo do preconizado. Já Vianna (2018) encontrou valores dentro do recomendado, porém mais próximo do limite inferior, diferentemente deste trabalho em que os valores estavam mais próximos do limite superior recomendado.

De acordo com o CODEX, integrado por membros da FAO e da OMS, que estabelece padrões e diretrizes internacionais na área de alimentos, recomenda-se que o conteúdo de proteína das FIs elaborados a partir do LV, independentemente de serem de fase 1 ou de fase 2, seja entre 1,8 a 3,0 g/100 kcal, e esse conteúdo não deve ultrapassar 3,0 g/100 kcal (KOLETZKO et al., 2005; WHO, 2007). Neste estudo, a maioria das formulações encontravam-se dentro dos limites mínimo e máximo quando comparadas à legislação brasileira, entretanto, ao correlacionar os valores encontrados com o recomendado pelo CODEX (2007), as FIs para lactentes ME1C (3,2 g/100 kcal), DM1A (3,1 g/100 kcal), DM1B (3,3 g/100 kcal) e as FIs de seguimento para lactentes ME2B (3,3 g/100 kcal), ME2C (3,1 g/100 kcal), NN2B (3,1 g/100 kcal), DM2A (3,2 g/100 kcal), DM2C (3,2 g/100 kcal), DA2A (3,2 g/100 kcal) e DA2C (3,1 g/100 kcal) ultrapassaram o valor recomendado de 3,0 g/100 kcal. Apesar da legislação brasileira, de uma forma geral, seguir as recomendações propostas pelo *Codex Standard for Infant Formula* (CODEX, 2007), observa-se diferença entre o limite máximo de proteína recomendado entre essas duas normas.

As questões relacionadas aos valores mínimos e máximos para o conteúdo proteico das FIs destacam-se pela ausência de consenso comum quando avaliado as diretrizes de outros países. Por exemplo, de acordo com a diretriz estabelecida pela Food and Drug Administration (FDA), órgão responsável por controlar e supervisionar FIs comercializadas dos Estados Unidos, o limite máximo estabelecido é de 3,5 g/100 kcal, assim como no Brasil, enquanto que na União Europeia, a Comissão Europeia atualizou a legislação relativa aos alimentos para lactentes, estabelecendo que o conteúdo mínimo e máximo de proteínas deve ser reduzido para 1,6 a 2,5 g/100 kcal, que inicialmente era 1,8 a 3,0 g/100 kcal (EC, 2016; FDA, 2016). Estudos realizados em diferentes países relataram que o conteúdo de proteína nas fórmulas à base de LV tiveram uma variação de 2,24 a 2,83 g/100 kcal nos países da Europa Ocidental (POMPEI et al., 1987), de 2,20 a 2,95 g/100 kcal no Canadá (SARWAR et al., 1989) e 3,2 a 6,0 g/100 kcal no Paquistão (KHAN & KISSANA, 1985).

As informações nutricionais presentes nos rótulos dos alimentos auxiliam o consumidor e profissionais da saúde a selecionarem uma dieta equilibrada, o que contribui para a diminuição da incidência de problemas de saúde relacionados a maus hábitos alimentares (GONÇALVES et al., 2015). A possibilidade de existir uma variação no conteúdo nutricional em relação ao declarado no rótulo pode acontecer. Desta forma, afim de resguardar os fabricantes de alimentos industrializados, foi estabelecido um percentual de tolerância aceitável em relação ao que está declarado. De acordo com a RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003, admite-se um limite de

tolerância de $\pm 20\%$ entre o valor declarado no rótulo e o valor analítico obtido (BRASIL, 2003b). Sendo assim, a avaliação dos resultados obtidos na análise das amostras de FIs foi feita considerando-se este limite de tolerância. Neste estudo, pelo menos um dos lotes de todas as marcas, com exceção da marca DM2, não atenderam à resolução, estando os valores acima deste 20% permitido em relação ao declarado no rótulo. Esta não conformidade caracteriza um risco à saúde do lactente do ponto de vista metabólico, já que o lactente irá ingerir uma quantidade maior de proteínas do que seu corpo é capaz de metabolizar.

A oferta excessiva de proteína em fases precoces da vida é de grande preocupação. Estudos demonstraram que o consumo excessivo de proteínas no início da vida está associada a um ganho de peso mais rápido durante a infância e, conseqüentemente, a um maior risco de obesidade na vida adulta (KOLETZKO et al., 2005; MONTEIRO & VCTORA, 2005; ONG & LOOS, 2006; DRUET et al., 2012; WENG et al., 2012; MICHAELSEN et al., 2014; GROTE et al., 2015; LUQUE et al., 2015). Uma elevada ingestão proteica nos primeiros anos de vida aumenta os níveis circulantes de aminoácidos libertadores de insulina, os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) que, por sua vez, estimulam a secreção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e de insulina. Estes irão ativar as vias de sinalização do crescimento celular, que promovem a atividade adipogénica e um rápido aumento ponderal. O aumento da atividade adipogénica e o rápido aumento ponderal culminam então para o aumento do risco de obesidade infantil, e a longo prazo pode levar à obesidade na vida adulta e doença cardiometabólicas (MARTIN et al., 2005; AGOSTONI et al., 2011; SOCHA et al., 2011; LIFSCHITZ, 2015). Além disso, os sistemas digestório e renal do lactente são imaturos, o que limita a sua capacidade em metabolizar componentes de alimentos diferentes do LM. Devido à alta permeabilidade do tubo digestivo, o lactente corre o risco de apresentar reações de hipersensibilidade a proteínas estranhas à espécie humana. O rim imaturo, por sua vez, não consegue reduzir a capacidade necessária de concentrar a urina para eliminar altas concentrações de solutos provenientes de alguns alimentos e acaba elevando a carga renal de solutos (ESCRIBANO et al., 2011).

Um grande estudo multicêntrico randomizado controlado conduzido por pesquisadores de vários países investigou os efeitos da ingestão precoce de proteínas sobre o crescimento e a adiposidade (OROPEZA-CEJA et al., 2018). Neste estudo, bebês saudáveis alimentados com FIs foram aleatoriamente designados para receber FIs elaboradas a partir do LV comerciais e formulações com alta concentração de proteína (2,9 e 4,4 g de ptns/100kcal, antes e após o 5º mês, respectivamente) e com baixa concentração de proteínas (1,77 e 2,2 g de ptns/100 kcal,

antes e após o 5º mês, respectivamente). Um grupo de bebês amamentados exclusivamente foi incluído para comparação. Os teores de proteínas presentes nas formulações preparadas para o estudo em questão representavam aproximadamente os valores mínimo e máximo da faixa estabelecida pela DIRETIVA 1991/271/CEE. A partir desse estudo foi possível concluir que formulações com alta concentração de proteína foram associadas a maior peso nos primeiros dois anos de vida, entretanto, não afetou o crescimento. Portanto, limitar o conteúdo proteico e a ingestão de proteína nas FIs para lactentes e nas FIs de seguimento para lactentes reduz o risco subsequente de sobrepeso e obesidade (KOLETZKO et al., 2009; WEBER et al., 2014). Logo, o ideal seria que o teor de proteínas das formulações estivesse mais próximo do limite mínimo. Neste estudo, a maioria das formulações estavam com os valores mais próximos do limite máximo.

Garantir a homogeneidade dos nutrientes presentes no produto final de diferentes lotes de uma mesma marca é uma das características fundamentais para a qualidade nutricional das FIs. Espera-se que o conteúdo nutricional do produto mantenha o mesmo padrão nutricional conhecido, uma vez que, em muitos casos, estas fórmulas são o único alimento ofertado para o lactente e diferenças nutricionais exorbitantes podem levar a um desenvolvimento infantil inadequado. Neste estudo, ao comparar os lotes de um mesmo fabricante, observamos certa uniformidade das marcas NC1, DM1, DA1, NC2, NN2, DM2 e DA2, enquanto as marcas ME1, NN1 e ME2, apresentaram diferença estatística no teor de proteína em pelo menos um dos lotes. Uma explicação para esta diferença pode ser o fato de que a composição do leite, seja de qual for a espécie, não tem exatamente o mesmo conteúdo de macro e micronutrientes, pois sua composição pode variar de acordo com diferentes fatores. No caso das FIs elaboradas a partir do LV, as variações na composição das proteínas podem ter sido influenciadas pela raça, período de lactação ou dieta do animal (MURPHY & O'MARA, 1993; WALSTRA et al., 2006), bem como pelas condições de processamento, método de purificação (filtração por membrana vs troca iônica) e processamento térmico das FIs (ONWULATA et al., 2004; WALSTRA et al., 2006).

O leite da maioria dos mamíferos é tipicamente classificado em proteínas insolúveis e proteínas solúveis no soro, em que se inclui as proteínas flutuantes menores associadas à MFGM. As CNs correspondem as proteínas insolúveis no leite e se encontram na forma micelar (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN e κ -CN), enquanto as proteínas do soro estão presentes na forma coloidal (β -Lg, α -La, Lf, Lz, BSA, Igs e outras proteínas solúveis menores, algumas dessas

inseridas na MFGM na forma glicosilada) (CAVALLETTO et al., 2008; CAO et al., 2019; MANONI et al., 2020).

A variedade na composição específica das proteínas no leite de cada espécie é mais acentuada no caso das proteínas do soro. Enquanto o LM contém predominantemente proteínas do soro, no LV predominam as CNs (ALMEIDA et al., 2013). A proporção entre as proteínas do soro e as CNs do LM é de aproximadamente 90/10 (colostró) e 60/40 (leite maduro), ao passo que no LV essa proporção é de 20/80. Dado que a quantidade de proteína total no LV é mais do que o dobro do LM, o LV contém consideravelmente mais CNs do que o LM. Isto é uma desvantagem, pois as CNs são proteínas de difícil digestão uma vez que elas coagulam no estômago devido ao seu pH ácido, as quais acabam agredindo as células do intestino causando problemas na absorção de nutrientes, sangramento intestinal, diarreia, anemia, cólicas, alergias e baixo peso do bebê (NUCCI et al., 2015). Além disso, sua lenta digestão faz com que a liberação de aminoácidos seja também mais lenta. Ao contrário das CNs, as proteínas do soro são proteínas de digestão rápida e altamente biodisponível (DONATO et al., 2007; GRIDNEVA et al., 2017).

Tradicionalmente, as FIs eram feitas a partir de LV sem nenhum processo adicional, e observava-se uma proporção de proteínas do soro e caseína de 20/80. Atualmente, como alternativa para reproduzir na fórmula a mesma proporção proteína do soro e CNs do LM, iniciou-se a suplementação do LV com soro de leite dessalinizado ou concentrado de proteína de soro de leite para produzir FIs baseadas predominantemente em proteínas do soro, sendo então a proporção entre CNs e proteínas do soro reduzida para 40/60 na FI. Neste estudo, a partir do perfil proteico determinado por eletroforese, foi possível identificar que a proporção de proteínas do soro foi maior do que a de CNs em todas as marcas de FIs avaliadas, o que demonstra que os fabricantes dessas marcas adotaram esta mesma estratégia.

O perfil e o conteúdo de CNs e proteínas específicas do soro de leite entre o LV e o LM também são diferentes entre si. As quatro principais moléculas de CNs são α_{s1} , α_{s2} , β e κ -CN, que agregam-se formando as chamadas micelas de caseína. O LM contém a maioria das subunidades (α_{s1} , β - κ - e γ -CN), exceto a variante α_{s2} -CN, sendo que a principal caseína encontrada corresponde a β -CN. A β -CN é uma proteína altamente fosforilada, que auxilia na absorção de Ca e, portanto, contribui para a absorção de Zn, e a κ -CN é uma proteína altamente glicosilada que demonstrou fornecer defesa contra infecções. No LV, as principais subunidades de CNs são α_{s1} -CN e α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN e γ -CN, com maior concentração de α -CN quando

somada suas duas variantes (LIVNEY et al., 2010; GUO, 2014; VINCENZETTI et al., 2017; LE et al., 2017).

As principais proteínas do soro do LM são α -La, Lf, Lz e IgA secretora, e uma variedade de outras menores frações, responsáveis por inúmeras bioatividades (GUO, 2014; GOLINELLI et al., 2014; LÖNNERDAL, 2016; ALMEIDA et al., 2021). Já o LV contém as principais proteínas identificadas no LM, entretanto em concentrações menores (SÁNCHEZ et al., 2017). Enquanto no LM, as frações de α -La e Lf estão predominantes no soro de leite, no LV predomina a β -Lg, representando aproximadamente 50% da proteína total do soro, enquanto α -La é representada por 20% do total (ALMEIDA et al., 2015a; CROWLEY et al., 2016). A β -Lg está ausente no LM e, por esse motivo, essa proteína é considerada um alérgeno potencial. A alergia à proteína do LV é o tipo mais comum de alergia alimentar em bebês e crianças pequenas, sendo caracterizadas por reações imunológicas quando o corpo é exposto a esta proteína. Na alergia à proteína do LV, o corpo da criança não reconhece uma ou mais proteínas do LV, levando a uma reação alérgica (KEITH, 2016; RANGEL et al., 2016).

Embora as atuais FIs comercializadas geralmente tenham a mesma proporção geral de CNs e proteína do soro do LM maduro, seu perfil de proteína do soro é diferente (HALABI et al., 2020). Esta característica vai ao encontro dos resultados aqui apresentados, em que, embora tenha sido observado uma maior proporção de proteínas do soro frente às CNs, a β -Lg correspondeu à proteína mais aparente dentre as presentes do soro de leite.

A partir do perfil proteico determinado por eletroforese foi possível identificar as principais proteínas lácteas (α -CN, β -CN, κ -CN, β -Lg, α -La e Lf) e indiretamente determinar outras proteínas menores. A técnica de separação das frações proteicas por eletroforese é amplamente utilizada para identificar e determinar o perfil proteico de matrizes alimentares complexas, como é o caso do leite, no qual é composto por diferentes frações de proteínas; além de ser uma técnica simples e de baixo custo. A eletroforese na presença de SDS (agente desnaturante) pode resultar na identificação de CNs e proteínas de soro de leite simultaneamente, no entanto as informações obtidas para as diferentes bandas de proteína em SDS-PAGE podem não ser tão precisas quanto as fornecidas separadamente por PAGE-ureia e PAGE-nativo para CNs e proteínas de soro de leite, respectivamente. As CNs, por exemplo, são semelhantes em tamanho e diferem muito pouco umas das outras, por isto, o uso da PAGE-ureia teria sido mais preciso para identificar e separar seus diferentes grupos. Na eletroforese realizada não foi possível separar as variantes da α_{s1} -CN e α_{s2} -CN, uma vez que a α_{s1} -CN tem peso molecular (23,6 kDa) muito próximo da β -CN (23,9 kDa) (SHARMA et al., 2021). Além

disso, quando confrontamos as análises realizadas por SDS-PAGE com a CLAE, observou-se que a κ -CN (a proteína aparentemente menos abundante nos géis) estava em maior concentração quando foi analisada por CLAE. Uma das explicações para isto, é o fato de que a κ -CN quando submetida a altas temperaturas, pode sofrer troca de dissulfeto de tiol com proteínas contendo ligações dissulfeto, como α -La, β -Lg, BSA, Igs e Lf. Isso resulta na formação de agregados de κ -CN que podem se mover lentamente ou permanecerem no topo durante a execução da eletroforese (SHARMA et al., 2021). Diante destas informações, o SDS-PAGE, apesar de ser um bom método para se avaliar o perfil de proteínas, sua baixa sensibilidade restringe a quantificação eficiente dessas proteínas. Dentre as análises de melhor sensibilidade e precisão para quantificação, destaca-se a CLAE de fase reversa, que faz uma abordagem mais padronizada na determinação das proteínas do leite. No entanto, para que se possa identificar o analito na corrida cromatográfica para a seguir quantificá-lo, é necessário injetar um padrão externo. Desta forma, os padrões de proteína injetados foram justamente aqueles que foram identificados nos géis, o que justifica o uso da eletroforese neste estudo.

Na análise por CLAE de fase reversa, os métodos utilizados para identificação e quantificação das proteínas majoritárias foram otimizados para o gradiente e a taxa de fluxo para melhorar a resolução dos picos. Com a metodologia modificada de Bonfatti et al. (2008) aplicada foi possível identificar e quantificar as principais proteínas do LV em uma única corrida e sem uma preparação laboriosa da amostra. Entretanto, apesar de ter sido identificado a Lf com esta metodologia, o seu pico co-eluiu juntamente com a β -CN, dificultando sua quantificação. Por isto optou-se por utilizar outra condição cromatográfica similar à utilizada por Dračková et al. (2009), no qual diferenciou-se pelo comprimento de onda (205 nm) e gradiente. A quantificação das frações proteicas por CLAE revelou que as proteínas com características bioativas, α -La (0,017 a 0,917 mg/mL) e Lf (0,014 a 0,101 mg/mL), estavam em baixa concentração nas formulações.

Em um estudo clínico em macacos *rhesus* realizado por Brück e colaboradores (2003), os autores avaliaram o potencial antimicrobiano da suplementação de FIs com α -La bovina (concentração entre 219,89 a 404,31 mg/L), afim de verificar se estas concentrações seriam capazes de promover uma microflora benéfica e assim prevenir uma infecção intestinal (causada por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococci* e *Candida albicans*). O estudo revelou que bebês alimentados com fórmula suplementada com α -La não tiveram diarreia, diferentemente daqueles alimentados com fórmula padrão (sem adição de α -La). Já a Lf tem bioatividade que inclui crescimento,

modulação imunológica e efeitos antimicrobianos (bacteriostáticos e bactericidas). Johnston et al. (2015) em seu estudo avaliaram o crescimento e a tolerância de bebês saudáveis através de um comparativo entre FIs tradicionais (fórmula controle) e FIs enriquecidas com Lf bovina em concentrações semelhantes às identificadas no LM maduro (0,6 a 1,0 g/L). O estudo revelou que estas concentrações seriam suficientes para demonstrar uma taxa de crescimento similar ao bebê amamentado e assim exercer sua bioatividade (QUEIROZ et al., 2013; LÖNNERDAL, 2014). Se levarmos em consideração estes estudos em particular, as formulações aqui avaliadas não teriam os mesmos efeitos clínicos observados nestes experimentos.

Com relação às concentrações das frações proteicas encontradas neste estudo foi encontrada grande heterogeneidade ao compará-las entre as marcas e entre seus lotes. Esta diferença pode ser explicada pelo simples fato de que tanto o conteúdo proteico do leite, quanto as proporções das proteínas individuais variarem por conta do período de lactação, da dieta, bem como do manejo aplicado na produção leiteira (BOBE et al., 1998). Ademais, as proteínas do leite estão entre os nutrientes mais sensíveis ao tratamento térmico, levando a alterações nas características funcionais e nutricionais (SOUZA et al., 2015; QIAN et al., 2017; LÖNNERDAL et al., 2017). As proteínas do soro podem sofrer desnaturação irreversível afetando sua conformação tridimensional, e conseqüentemente sua funcionalidade (GOLKAR et al., 2019). A α -La, por exemplo, pode perder a capacidade de ligação ao Ca e ao Zn, e assim diminuir a biodisponibilidade desses nutrientes. Por outro lado, a Lf tende a perder sua ação microbiana devido ao aquecimento (GOLINELLI et al., 2014). Já as CNs são menos afetadas pelo calor quando comparadas às proteínas presentes no soro de leite, permanecendo estáveis (RAIKOS, 2010). Como previamente discutido, o LV tem concentrações menores de α -La e Lf em comparação com o LM (DEMMELMAIR et al., 2017; LIAO et al., 2017), o que vai de encontro ao achado neste estudo, em que se observou uma concentração baixa de α -La e Lf em todas as formulações avaliadas.

O soro do LV é um subproduto da produção de queijos e derivados lácteos. Embora o soro de leite seja denominado como um subproduto, ele é um importante ingrediente com grandes quantidades de lactose, proteínas de elevado valor biológico e minerais, que ao utilizar de diversas tecnologias de concentração, filtragem e secagem pode ser transformado em ingredientes naturais versáteis e ricamente nutritivos (KESSLER, 2002). Esses ingredientes são amplamente utilizados pela indústria de nutrição esportiva, médica e de FIs (OSTERTAG et al., 2020). As proteínas do soro podem exibir diferenças na sua composição dependendo da forma utilizada para sua obtenção. O que define a composição final destes ingredientes e seu

alto grau de pureza são as etapas utilizadas para a sua preparação (tecnologia de membrana, osmose reversa, ultrafiltração, microfiltração, hidrólise enzimática, cristalização, secagem por *spray drying*). O soro reutilizado pode ser vendido como concentrado protéico de soro de leite (percentual de proteína pode variar de 34 – 80%), isolado proteico de soro de leite (contém entre 90 – 95% de pura proteína de soro de leite) ou hidrolisado protéico de soro. Além disso, deve-se considerar também que a composição do soro gerado na produção dos derivados lácteos pode ser influenciado pelo tipo de processamento utilizado na produção destes produtos, soro de leite doce obtido por coagulação enzimática e soro de leite ácido obtido por precipitação ácida (OSTERTAG et al., 2020). Com base nesse conhecimento é possível explicar a heterogeneidade encontrada na composição entre as diferentes marcas e seus lotes, principalmente quando se trata das frações de proteínas presentes neste soro.

O suprimento de aminoácidos no primeiro mês de vida de uma criança deve ser suficiente em quantidade e qualidade para atender às necessidades fisiológicas (ALEGRÍA et al., 1999). O conteúdo referente aos aminoácidos essenciais está diretamente relacionado ao perfil proteico presente em uma fonte alimentar. As frações proteicas do soro são ricas em aminoácidos essenciais, diferentemente quando comparado às CNs (HALL et al., 2003). Desta forma, assim como o perfil proteico, o perfil geral de aminoácidos do LV também vai diferir do LM, por isto que surgiu a ideia de suplementar as FIs com proteínas do soro do LV, pois além de terem melhor digestibilidade e menor poder alergênico, são proteínas com melhor aporte de aminoácidos essenciais (NUCCI et al., 2015; DONOVAN et al., 2019). Um estudo realizado por GUO (2014) comprovou que bebês alimentados com fórmula obtiveram maiores disparidades nos aminoácidos plasmáticos em comparação com bebês amamentados, com os níveis de triptofano em particular sendo comprovadamente mais baixos.

Em relação ao conteúdo de aminoácidos essenciais, a legislação estabelece que as FIs devem conter por 100 kcal uma quantidade disponível de cada aminoácido essencial e semi-essencial pelo menos igual à contida na proteína de referência, no qual utiliza-se o LM como base. Os teores de aminoácidos essenciais do LM (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b) e o grau de conformidade, que se refere à relação entre a concentração obtida neste estudo e o teor estabelecido pelas RDCs (em mg/kcal) revelou que grande parte das fórmulas analisadas apresentaram conteúdo de aminoácidos inferiores aos valores estabelecidos pela legislação, exceto no caso da treonina nas amostras ME1, ME2, DM1, DM2, DA1 e DA2 em que os valores ficaram acima do valor de referência (77 mg/kcal), e da metionina nas amostras NC1, NC2,

NN1, NN2, DM1, DM2 e DA1 que também ficaram acima dos valores de referência (24 mg/kcal).

A maioria dos aminoácidos essenciais estava presente em todas as FIs, entretanto, em níveis muito abaixo dos valores considerados ideais. Uma possível explicação para a baixa concentração dos aminoácidos essenciais é o fato de que o conteúdo referente às proteínas do soro, a α -La e a Lf, proteínas de melhor aporte de aminoácidos essenciais estarem também muito baixas nas formulações analisadas por CLAE. Confrontando os valores obtidos experimentalmente com outros trabalhos foi observado que as FIs analisadas em outros estudos apresentaram o conteúdo de aminoácidos essenciais superior aos valores de referência, e todas elas tiveram como primeiro aminoácido limitante o triptofano, corroborando com o encontrado neste estudo, em que o triptofano foi um dos aminoácidos com menor concentração (ALEGRÍA et al., 1999; AGOSTINE et al., 2000; VENTURA et al., 2012). Uma comparação dos resultados da literatura é um desafio porque os valores dependerão da amostra analisada, uma vez que alguns destes trabalhos analisaram fórmulas com teor de proteína adaptado para ajustar a composição de aminoácidos essenciais à do LM, diferentemente das FIs comerciais avaliadas neste trabalho. Além disso, a metodologia utilizada na análise não foi a mesma utilizada neste experimento.

A comparação dos perfis de aminoácidos mostrou diferenças significativas nos aminoácidos essenciais ao comparar as formulações e seus lotes. Esta heterogeneidade está diretamente relacionada à heterogeneidade encontrada para as frações proteicas analisadas. Assim como o perfil proteico, o perfil geral de aminoácidos do LV também varia dependendo do estágio da lactação, da raça e manejo do animal, processamento térmico, dentre outros, como já descritos. Além disso, a determinação do conteúdo de aminoácidos de uma proteína é uma análise relativamente complexa que envolve a hidrólise completa dessa proteína para liberação dos resíduos de aminoácidos, seguida de análise cromatográfica e quantificação dos aminoácidos liberados (DARRAGH & MOUGHAN, 2005). Na literatura, muitas tentativas foram feitas para detectar aminoácidos por diversas técnicas cromatográficas, sendo que a mais utilizada é a pré-derivatização dos resíduos de aminoácidos para serem detectados por fluorescência. Neste estudo foi aplicado um método de cromatografia bidimensional para separar, identificar e quantificar os resíduos de aminoácidos essenciais por cromatografia bidimensional, acoplado a um detector de CAD corona. Na cromatografia bidimensional, a amostra é submetida a dois mecanismos de separação diferentes ou complementares, que tem como finalidade fornecer um maior poder de separação e distribuição dos analitos nas duas

dimensões, aumentando o poder de resolução. O CAD corona é um detector universal capaz de identificar quaisquer compostos não-voláteis e semi-voláteis, com ou sem cromóforos, como os aminoácidos (GAMACHE et al., 2005). Os resultados obtidos demonstraram que as condições cromatográficas foram satisfatórias, uma vez que se mostrou capaz de separar e identificar os nove aminoácidos. No entanto, supõem-se que a baixa concentração destes aminoácidos possa ter ocorrido devido à hidrólise proteica (etapa de preparo da amostra). Uma hidrólise realizada corretamente é um pré-requisito para uma análise bem-sucedida (FOUNTOULAKIS et al., 1998). Ao avaliar a eficiência da hidrólise, verificou-se que o método de hidrólise ácida utilizada neste experimento não é igualmente ideal para todos os resíduos de aminoácidos. Aminoácidos como o triptofano, que apresentou a menor concentração quando comparado aos outros aminoácidos, tem melhor rendimento com hidrólise alcalina. No entanto, este método de hidrólise tem a desvantagem de destruir aminoácidos como a serina, treonina, arginina e cisteína, além de causar racemização de outros aminoácidos (FOUNTOULAKIS et al., 1998), por isto, optou-se por fazer um único método de extração. Logo, pode se concluir que não há um método de extração considerado ouro. O ideal seria ter aplicado os dois métodos disponíveis.

A digestibilidade é a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas, tornando-se biodisponível para a efetiva absorção pelo organismo na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado (PIRES et al., 2006; RUTHERFURD et al., 2012). A composição proteica, como as quantidades de CNs e proteína do soro de leite, influencia as propriedades de digestão das FIs (TARI et al., 2018). A cinética da degradação de proteínas durante a digestão e subsequente liberação e absorção de aminoácidos pode ser influenciada pela estrutura da matriz alimentar e composição da proteína. Diferentes composições de proteínas não apenas geram diferentes tipos de peptídeos e aminoácidos para absorção e têm diferentes influências nas funções fisiológicas, mas também levam a diferentes cinéticas de digestão, taxas de esvaziamento gástrico, saciedade e extensões de hidrólise. Isso se deve às diferenças na resistência à proteólise enzimática no trato gastrointestinal e no comportamento de coagulação em condições gastrointestinais (TURGEON & RIOUX, 2011; LE FEUNTEUN et al., 2013; TARI et al., 2018; YE et al., 2019).

A fase gástrica é um estágio crítico no processo de digestão, não apenas por causa de seu papel em levar a digesta ao duodeno e regular a digestão intestinal, mas também porque a hidrólise de proteínas começa neste estágio (TARI et al., 2018). Neste estudo optou-se por avaliar a digestibilidade através de um método *in vitro*, em que foram simuladas as condições

fisiológicas, utilizando-se fluidos preparados com sais minerais, compostos e enzimas orgânicas, e seguiu-se a sequência de eventos que ocorrem durante os estágios gástrico e intestinal, semelhantes às condições fisiológicas encontradas no corpo humano. Sabendo-se que as proteínas são digeridas apenas no trato gastrointestinal, a fase oral não precisou ser realizada, logo, não foi necessário requerer autorização prévia do comitê de ética. Avaliando os resultados da bioacessibilidade, observou-se que todas as FIs apresentaram boa bioacessibilidade (> 90% do IVPD) tanto na fase gástrica quanto na intestinal com discreta diferença significativa entre elas. Em relação à fase intestinal, não foram observadas diferenças estatísticas em relação à bioacessibilidade entre todas as fórmulas da fase 2. O percentual de digestibilidade do LM, por consequência de suas características de composição, estrutura física das proteínas e dos glóbulos de gordura, diferem da digestibilidade do LV (BALTHAZAR et al., 2017). De acordo com Lacroix et al. (2006), a digestibilidade das CNs está em torno de 85% no LV e 94% em humanos, enquanto as proteínas do soro de leite são valores de IVPD% relatados neste estudo são comparáveis com aqueles documentados por Sousa (2020) e Maathuis et al. (2017), no qual variou de 85-95%. Tomados em conjunto os resultados encontrados na simulação das digestões gástrica e intestinal, pode-se confirmar que as proteínas presentes nas FIs de fase 1 e 2 estão disponíveis para digestibilidade e absorção pelo organismo infantil.

A metodologia utilizada para avaliar a qualidade da proteína nos alimentos foi descrita em um relatório criado por especialistas da área. De acordo com o grupo de especialistas em nutrição infantil, o PDCAAS é a abordagem mais adequada para avaliação da qualidade da proteína para humanos, recomendando a adoção deste método como um método oficial em nível internacional (WHO, 2007). Neste estudo, a qualidade da proteína em FIs obtidas a partir do LV não modificado teve seu valor expresso primeiramente através do escore químico de aminoácidos (AAS), e a seguir este valor foi corrigido pela digestibilidade proteica (PDCAAS). Uma pontuação química inferior a 1,0 significa que um determinado aminoácido é limitante na fonte proteica e, portanto, insuficiente para atender às demandas de aminoácidos essenciais. De acordo com a FAO/WHO (2007) e o IOM (2002), o valor calculado deve ser equivalente a pelo menos 80% da proteína do LM utilizada como padrão. O fato da concentração de aminoácidos essenciais ter sido abaixo do ideal, quando comparado ao LM, explica o porquê os valores encontrados para o AAS e para o PDCAAS apontaram que a maioria dos aminoácidos essenciais foram limitantes, não alcançando os valores-alvo. O único aminoácido que obteve um bom escore químico foi a treonina em todas FIs de fase 1 e apenas na amostra DM2 de fase 2, no qual foi acima de 80%.

Em um estudo realizado Maathuis e colaboradores (2017), no qual avaliaram a digestibilidade de proteínas do LM, os autores revelaram que proteínas intactas foram encontradas nas fezes de bebês amamentados, sugerindo que nem todos os aminoácidos disponíveis no LM são digeridos pelo bebê. Diante desta informação, é importante salientar que o conteúdo de aminoácidos do LM não pode ser considerado uma representação precisa da quantidade de aminoácidos utilizáveis pelos lactentes, mas sim ser usado apenas como uma referência a ser alcançada.

De acordo com as normas para elaboração das FIs podem ser adicionados aminoácidos essenciais e semi-essenciais para melhorar a qualidade das proteínas, mas somente em quantidades necessárias para este fim (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b). Levando em consideração que os valores encontrados neste estudo estiveram muito abaixo do esperado, uma alternativa para melhorar a qualidade das proteínas presentes nessas formulações seria a suplementação de aminoácidos essenciais livres às FIs ou adição de proteínas de elevado valor biológico, como a α -La (KELLEHER et al., 2003; DAVIS et al., 2008; LAYMAN et al., 2018). O enriquecimento de FIs com α -La bovina, tem sido objeto de muitos estudos clínicos, e vem demonstrado uma melhora no perfil plasmático de aminoácidos essenciais, bem como um desenvolvimento infantil mais próximo às crianças amamentadas (LIEN, 2003; DAVIS et al., 2008; SANDSTRÖM et al., 2008; TRABULSI et al., 2011). A α -La bovina é particularmente uma proteína de elevado valor biológico por conter uma concentração elevada de aminoácidos essenciais, principalmente o triptofano, cisteína e lisina semelhante ao LM (DAVIS et al., 2008; GOLINELLI et al., 2014; NUCCI et al., 2015; DONOVAN, 2019).

Vale ressaltar que estudos sobre o escore de aminoácidos em FIs à base de LV são escassos na literatura. Como observado na análise das frações protéicas, assim como para os aminoácidos essenciais, a composição é variável, e grande parte dos estudos só relatam o conteúdo total de proteínas, dificultando uma comparação precisa.

5.2 Análise de minerais essenciais e metais potencialmente tóxicos em FIs

5.2.1 Minerais essenciais

Os minerais estão envolvidos em muitas funções importantes no corpo e por isso é importante que quantidades suficientes dessas substâncias estejam disponíveis nos alimentos. Crianças se tornam mais vulneráveis às deficiências de minerais essenciais uma vez que estão

em acelerado crescimento e desenvolvimento. Por isto, uma avaliação da ingestão diária de macrominerais (Ca, Mg, Na, K e P), bem como de microminerais (Fe, Zn, Cu, Cr, Mo, Se, I, Co e Mn) por crianças que consomem apenas as FIs é crucial. Quando ocorre a deficiência desses minerais são estabelecidas condições para o aparecimento de algumas doenças que acometem de forma mais prejudicial crianças, dentre elas, a anemia ferropriva, a desnutrição, hipocalcemia, dentre outras, comprometendo assim o desenvolvimento infantil (BRASIL, 2007; MELØ et al., 2008; FERGUSON et al., 2015). O conteúdo de macrominerais (Ca, Mg, K e P) e microminerais (Fe, Zn, Cu, Cr e Mn) encontrado nas FIs avaliadas foram próximos aos relatados por Lesniewicz et al. (2010) e Moreno-Rojas et al. (2015), no qual também apresentaram o Ca, K e P como macrominerais mais abundantes nas FIs avaliadas.

A Organização Mundial da Saúde fez recomendações quanto à ingestão diária de minerais para bebês e crianças pequenas (IBFAN, 1994). As necessidades nutricionais para os minerais representam valores fisiológicos individuais requeridos para satisfazer as funções fisiológicas normais e prevenir sintomas de deficiências (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006). Os valores de referência de ingestão dietética (*Dietary Reference Intakes*, DRIs) foram desenvolvidos para auxiliar no planejamento alimentar e avaliar se a ingestão de um determinado nutriente atende às exigências de um indivíduo ou uma população. Ao calcular a DRI, além da concentração do mineral, deve ser levado em consideração a frequência de consumo e o peso médio de uma criança de 0 a 6 meses de idade no qual recomenda-se o consumo de FIs de fase 1 e o peso médio de uma criança de 7 a 12 meses no qual recomenda-se o consumo de FIs de fase 2. A seguir, o resultado deste cálculo é comparado a diferentes valores (EAR, AI e/ou UL) usados como meta de ingestão dietética para indivíduos saudáveis. Para as crianças menores de 1 ano de idade utilizam-se os valores de AIs em vez dos valores de EARs. Entretanto, no caso do Fe e do Zn, para uma criança de 7 a 12 meses recomenda-se a utilização das EARs, uma vez que esta é uma fase de maior demanda por estes minerais (BARGELLINI et al., 2018; ILSI BRASIL, 2018). No presente estudo verificou-se se o consumo das FIs atenderia ou excederia as AI ou EAR (no caso específica do Fe e Zn), para os minerais aqui estudados.

Comparando-se os resultados obtidos no cálculo da DRI com os valores de referência preconizados pelo Institute of Medicine (2006) foi identificado que todas as marcas e seus lotes de fase 1 (0,03 a 0,08 mg/peso/dia) e de fase 2 (0,04 a 0,07 mg/peso/dia) apresentaram o conteúdo de iodo abaixo do valor recomendado de 0,11 mg/peso/dia (0 a 6 meses) e 0,13 mg/peso/dia (7 a 12 meses). A deficiência de iodo pode causar retardo mental grave e

irreversível, surdo-mudez, anomalias congênitas, bem como a manifestação clínica mais visível, como o aumento da glândula tireoide, formando um bócio (GUO, 2014). Em relação aos outros minerais, todos os resultados obtidos para as FIs de fase 1 estavam acima do valor estabelecido para o AI, revelando que a concentração desses minerais estudados (exceto no caso do iodo) atenderia as necessidades diárias. Quanto aos resultados encontrados para os outros minerais nas FIs de fase 2, exceto pelo valor obtido para o Mn que foi baixo em todas as marcas e para o Mg que foi baixo nas marcas ME2, NN2, DM2 E DA2, todos os outros minerais analisados atenderiam as necessidades requeridas para uma criança de 7 a 12 meses que consumisse as FIs de fase 2. O Mn é um nutriente essencial envolvido na formação dos ossos e no metabolismo de aminoácidos, colesterol e carboidratos. Apesar da deficiência de Mn contribuir para um ou mais sintomas clínicos, uma vez que está envolvida em diferentes vias metabólicas, sua deficiência clínica não foi claramente associada a uma ingestão alimentar inadequada em crianças saudáveis (TRUMBO, 2001). O Mg atua como cofator de enzimas responsáveis por diversas atividades metabólicas, pela resposta imune inata e adquirida, além de seu papel importante na maturação dos tecidos e células linfoides. Sua deficiência pode comprometer o funcionamento do sistema imune, levando à imunossupressão (MACÊDO et al., 2009).

O valor obtido para o Fe nas FIs de fase 2 foi comparado ao valor de referência (EAR = 6,9 mg/peso/dia). Dentre as amostras de FIs de fase 2 analisadas, exceto pelas formulações NN2B e NN2C, todas as outras tiveram valores dentro do ideal, indicando assim que a concentração de Fe nas FIs de fase 2 está suficiente para atender à demanda de uma criança na fase dos 7 a 12 meses. Ao confrontar o valor obtido para o Zn com o valor de referência para a EAR (2,5 mg/peso/dia) observou-se que todas as formulações de Fase 2 (3,5 a 7,2 mg/peso/dia) tiveram valores acima do valor de EAR estabelecido.

Alguns minerais podem constituir um risco potencial à saúde quando consumidos acima dos níveis superiores de ingestão toleráveis (UL) por um período prolongado. Metais como Fe, Zn e Se apesar de serem essenciais em certas quantidades, quando ingeridos em excesso podem causar efeitos adversos à saúde (SARACOGLU et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2011; PANDELOVA et al., 2012; MORENO-ROJAS et al., 2015). Para se estabelecer o limite máximo tolerável utiliza-se como referência o UL, que é o valor mais alto de ingestão diária de um nutriente que aparentemente não oferece nenhum efeito adverso à saúde. À medida que a ingestão aumenta e ultrapassa este valor, o risco potencial de efeitos adversos também aumenta. O valor de UL ainda não está estabelecido para todos os nutrientes. Para a faixa etária estudada,

o UL só foi definido para o Fe, Zn e Se (USDA, 2010). Vale salientar que a falta de um UL não significa que o risco de efeitos adversos não possa existir a partir de grandes quantidades de outros minerais ingeridos, e sim que os dados ainda não estão disponíveis. Neste estudo, ao calcular a ingestão diária, observou-se que os valores obtidos para o Fe não ultrapassaram o limite tolerável em nenhuma das FIs avaliadas. No entanto, os valores encontrados para o Zn (UL = 5 mg/peso/dia) nas amostras ME1A (5,2 mg/peso/dia), NC1A (5,0 mg/peso/dia), NC1B (5,0 mg/peso/dia), NC1C (5,0 mg/peso/dia), NN1A (5,1 mg/peso/dia), NN1B (5,9 mg/peso/dia) e NN1C (5,2 mg/peso/dia) e para o Se (60 µg/peso/dia) em todos os lotes da DM2 (120,0; 181,4; 77,6 µg/peso/dia), estavam próximos ou ultrapassaram o limite (UL). A ingestão de Zn a longo prazo, maior do que o necessário, pode interferir no metabolismo de outros oligoelementos, como o Cu, reduzindo sua absorção e causando anemia, além de afetar o sistema imunológico (KOLETZKO et al., 2005), entretanto foi relatado que a absorção reduzida de Cu parece estar presente apenas em altas ingestões de Zn (OSREDKAR et al., 2011; CONCHA et al., 2013). Já na superexposição humana ao Se, apesar de não estar bem definida, as características clínicas mais comuns relatadas até o momento foram queda de cabelo e mudanças estruturais na queratina do cabelo e das unhas, o desenvolvimento de pele ictérica e distúrbios gastrointestinais, entretanto nenhum desses sintomas estavam relacionados a crianças na primeira infância (LEVANDER, 1997).

Muitas indústrias produtoras de FIs adicionam minerais nestes produtos em níveis de concentrações maiores do que presentes no LM para compensar a sua biodisponibilidade, o que de certa forma preocupa a confiabilidade dos valores de nutrientes declarados nos rótulos destes alimentos. Neste estudo, as maiores diferenças observadas em relação ao valor obtido e o valor declarado foram para K, Zn, I, Se e Mn, no qual o K (exceto NC2 e NN2), Zn (exceto ME1 e DM2) e o I, sendo estes inferiores a 20% do valor declarado, enquanto o Se e o Mn foram superiores a 20% ao valor declarado. Entretanto, mesmo considerando os valores \pm 20% ao declarado no rótulo, a inadequação quanto aos valores máximos e mínimos estabelecidos na legislação vigente, só foi observada para o Se e I. Em relação ao Se o valor obtido para a marca DM2 (20,4 µg/100kcal) estava 126% acima do limite superior de referência (LSR). O excesso de Se observado nesta amostra reflete o valor observado no cálculo da ingestão diária, no qual o Se demonstrou estar acima do UL estabelecido. Além disso, ao calcular a ingestão diária para o Se e compará-lo com o valor de referência, confirmou-se que o resultado encontrado foi superior ao nível máximo de ingestão tolerável. Já os valores obtidos para o I nas amostras ME1 (7,38 µg/100kcal), NC2 (7,91 µg/100kcal), NN1 (8,10 µg/100kcal), NN2 (9,82 µg/100kcal) e

DA2 (6,04 $\mu\text{g}/100\text{kcal}$) foram abaixo do limite inferior (10 $\mu\text{g}/100\text{kcal}$) (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b).

5.2.2 Metais potencialmente tóxicos nas FIs

As FIs podem conter metais potencialmente tóxicos derivados da presença natural desses contaminantes na matéria prima utilizada na sua elaboração ou por contaminação destes durante o processamento e armazenamento (MEHARG, et al., 2008; KAZI, et al., 2010). A presença de contaminantes químicos, como o Hg, As, Cd, Pb, Al, Sn e U no leite pode ocorrer em função de fatores relacionados às condições ambientais, às práticas tecnológicas e ao uso indiscriminado de produtos químicos no manejo e na produção animal (AKHTAR et al., 2015; CRUZ et al., 2019; PEREIRA et al., 2020).

Os metais não essenciais possuem propriedades potencialmente tóxicas mesmo em concentrações extremamente baixas. Além disso, foi sugerido que o Hg, Cd, Pb e Al podem interagir metabolicamente com minerais nutricionalmente essenciais, tais como Ca, Cu, Zn, Fe, Mn e Se, pela competição por ligantes nos sistemas biológicos, diminuindo a absorção destes minerais ou aumentando os riscos à saúde associados aos metais tóxicos, uma vez que compartilham características químicas comuns (ABDULLA & CHIMIECLNICKA, 1990; GOYER, 1997). A deficiência de Fe, por exemplo, pode aumentar a absorção de Cd, Pb e Al. O Pb interage com o Ca no SNC prejudicando o desenvolvimento cognitivo, além de substituir o Zn nas enzimas heme, assim como o Cd, interferindo assim na capacidade do organismo em sintetizar a hemoglobina. O Cd e o Al interagem com o Ca nos ossos e rins, resultando em osteodistrofia, além de contribuir para a doenças degenerativas do sistema nervoso como o mal de Alzheimer em indivíduos idosos, mas essa relação tem sido controversa. Ademais, a deficiência de Ca junto com o baixo teor de Mg na dieta pode ser induzida pelo Al (GOYER, 1997). Em contrapartida, minerais como o Se tem o poder de proteger contra a toxicidade do Hg e do metilmercúrio (RÖLLIN et al., 2018).

Bebês e crianças são mais vulneráveis e sensíveis aos efeitos dos metais tóxicos do que adultos, devido ao rápido crescimento, à imaturidade fisiológica dos órgãos e a susceptibilidade do SNC no primeiro ano de vida (CARIGNAN et al., 2015; CHOI et al., 2017). Além disso, devido às taxas metabólicas serem mais elevadas, eles tendem a consumir mais alimentos do que um adulto, aumentando assim a relação entre a quantidade ingerida por peso corporal (FAIRBROTHER et al., 2007; PANDELOVA et al., 2012). Se for avaliada a exposição a essas

substâncias em um dado período e levada em consideração a frequência do consumo de um determinado alimento, como as FIs que são ofertadas várias vezes ao dia, os danos podem ser ainda mais sérios (WHO, 2009).

Para avaliar o potencial risco de toxicidade a um determinado contaminante, utiliza-se o QR (quociente de risco). O QR é obtido a partir da razão entre a exposição a um contaminante e a dose oral de referência (RfD). Se o QR for menor que 1,0, não há risco evidente, mas se o QR for acima de 1,0, pode haver a possibilidade de efeitos prejudiciais à saúde da criança que consumir a fórmula. Considerando a média de consumo das FIs nos primeiros seis meses, em que recomenda-se o uso de FIs de fase 1, bem como a média de consumo entre 7 a 12 meses, no qual recomenda-se o uso de FIs de fase 2, os resultados da avaliação de risco mostraram que se o consumo dessas fórmulas acontecessem neste dado período da vida do lactente, o mesmo não indicaria risco de toxicidade ao lactente ($QR < 1,0$), sendo um alimento seguro em termos de Hg (não detectado), As, Cd, Pb e U, exceto no caso do As na amostra DA1A ($QR_{As} = 1,32$) e do U na amostra DA2A ($QR_U = 1,00$). Em relação ao Hg, este foi o único metal no qual a maioria das amostras não teve sua concentração detectada na análise, indicando que sua concentração estava abaixo do limite de detecção do método, não sendo possível calcular o QR. No entanto, uma única amostra (NC1C) em que houve a identificação do Hg, o QR foi abaixo de 1,0 (0,1 $\mu\text{g/g/peso/dia}$), concluindo assim que esta amostra em particular é segura quanto ao Hg.

Ao avaliar o risco de toxicidade para o Al, exceto pelas amostras NC1A, NC1B, DM1A, DA1B, NN2C, DM2B e DM2C, no qual as concentrações obtidas estavam abaixo do LOQ, todas as outras demonstraram ser potencialmente tóxicas para o lactente. Resultados similares relacionados ao excesso de Al em FIs também foram encontrados em outros estudos (BAXTER et al., 1991; KAZI et al., 2009; BURRELL et al., 2010; CHUCHU, 2013). Kazi et al. (2009), assim como Burrell et al. (2010), ao medirem a concentração de Al nas FIs, descobriram que a maioria das formulações continham um teor elevado de Al, no entanto, ambos descreveram que o teor foi maior nas FIs à base de soja em comparação às formulações à base de LV, provavelmente devido ao fato de que a soja é uma fonte significativa de contaminação por Al (KAZI et al., 2009). Em 2013, o mesmo grupo de autores fez uma nova publicação e novamente relataram um excesso de Al em 30 marcas de FIs disponíveis no mercado do Reino Unido (CHUCHU et al., 2013). Um relatório publicado em 2011 sobre FIs canadenses revelou que este tem sido um problema comum e que vem sendo detectado em FIs comercializadas em outros países (DABEKA et al., 2011).

A contaminação das FIs por Al pode ter inúmeras origens, seja pela sua presença na matéria prima, que pode ter ocorrido devido à alimentação do animal com forragens contaminadas por Al ou pela água contaminada que o animal consumiu; ou pelo uso de aditivos utilizados como antiaglomerantes, embora não haja indicação de que sejam usados desta forma nas FIs em pó (SAIYED & YOKEL, 2005). Bem como pode ter ocorrido através dos equipamentos utilizados no processamento e armazenamento de produtos a granel (BURRELL et al., 2010). Além disso, muitas das FIs são embaladas em latas, no qual usam materiais à base de Al. No presente estudo, todas as FIs avaliadas estavam acondicionadas em latas de Al e todas continham um selo de folha (lacre) de Al destacável entre o pó e a tampa de plástico. É provável que estas embalagens contenham quantidades substanciais de Al, e uma parte deste possa ter migrado para o pó. Embora não haja nenhum estudo científico que tenha determinado se a embalagem usada no armazenamento de FIs é uma fonte potencial de contaminação por Al, um fabricante de fórmula admitiu que o Al encontrado na fórmula em pó de um consumidor veio da embalagem à base de Al (CHUCHU et al., 2013).

O Al é o elemento metálico mais comum, mas não tem ainda função biológica totalmente conhecida. Sabe-se que sua toxicidade esta geralmente associada a indivíduos com função renal prejudicada, ou quando a exposição a este elemento é muito alta. Em humanos, foi demonstrado que uma vez que a carga de Al excede a capacidade excretora do corpo, o excesso se deposita em vários tecidos (ossos, cérebro, fígado, coração, baço e músculos), prejudicando estes sistemas corporais (BINGHAM & COHRSSSEN, 2012; RÖLLIN et al., 2018). Até onde se sabe, a exposição ao Al durante os estágios de desenvolvimento produz toxicidade que pode prejudicar o crescimento ou desenvolvimento infantil, interferindo no ciclo da GTPase, (interferem no sinal entre receptores acoplados as proteínas), na citotoxicidade mediada por radicais livres, peroxidação lipídica e alterações nos elementos essenciais do soro (RÖLLIN et al., 2018). Portanto, a vulnerabilidade dos bebês à exposição precoce ao Al aponta para uma necessidade urgente de reduzir o conteúdo de Al nas FIs ao nível mais baixo possível, uma vez que essa superexposição pode impactar a saúde do bebê em desenvolvimento e aumentar a suscetibilidade a uma série de doenças (BURRELL et al., 2010; FEWTRELL et al., 2011).

Em relação ao Sn, exceto pelas amostras ME1A e ME1B, no qual tiveram um QR abaixo de 1,0 e aquelas que tiveram concentração abaixo do LOQ (ME1C, ME2A e ME2B), todas as outras amostras indicaram não serem seguras. A principal via de exposição humana ao Sn é através de alimentos enlatados. O Sn é utilizado na fabricação de folhas de flandres que revestem o interior das latas como inibidor de corrosão da lata (ABNT, 2006). O principal efeito

adverso em humanos, já relatado, estava relacionado ao consumo de grandes quantidades de compostos inorgânicos de Sn em bebidas enlatadas (acima de 150 µg/g) ou outros alimentos enlatados (acima de 250 µg/g), no qual os principais sintomas encontrados foram irritação gástrica aguda, anemia e problemas de fígado e rins. Até o momento não há evidência de efeitos adversos em humanos associados à exposição crônica ao Sn, pois mesmo em excesso, é pobremente absorvido no trato gastrointestinal, sendo excretado pelas fezes (WHO, 2003b). Em relação aos efeitos adversos à saúde de crianças expostas ao Sn, até o momento, não existem estudos sobre esses efeitos. No entanto, é razoável supor que as crianças exibam o mesmo tipo de efeitos sobre a saúde observados em adultos expostos. No entanto, não se sabe se as crianças são mais suscetíveis aos efeitos da exposição ao Sn e a seus compostos do que os adultos. Ademais, não há relatos de Sn ou de compostos de estanho no LM, e não há evidência direta em animais de transferência desses compostos por meio da amamentação (ATSDR, 2005).

Ao comparar os valores calculados dos QRs para os metais entre os lotes, observou-se uma diferença estatística, tanto entre os lotes das FIs de fase 1, quanto entre os lotes das FIs de fase 2. Isto se deve principalmente ao fato de que a concentração destes metais terem variado entre as amostras. Deve-se levar em consideração as recomendações de consumo diário descritas nos rótulos que difere também entre as marcas. Complementarmente, vale ressaltar que a partir do sexto mês se inicia a diversificação alimentar. Considerando a possibilidade da presença destes metais tóxicos em outros alimentos e a bioacumulação destes no organismo, o QR analisado nas FIs de fase 2 deveria levar em consideração outros alimentos ofertados nesta fase de diversificação alimentar.

5.3 Conformidade da rotulagem das FIs

A RDC nº 43/2011 e a RDC nº 44/2011 da ANVISA estabelecem os requisitos mínimos de identidade, composição, qualidade e segurança que devem ser obedecidos e considerados pelos fabricantes de FIs. Elas determinam e especificam a composição essencial referente aos teores de proteína, gordura, vitaminas, minerais e os limites de outros ingredientes que podem ser adicionados à formulação, levando em consideração os componentes e concentração normalmente encontrados no LM (BRASIL, 2011a; BRASIL 2011b). No presente estudo, também avaliou-se a conformidade da rotulagem de FIs para lactentes e de seguimento para lactentes, quanto às informações veiculadas através de seus rótulos.

Em muitos casos a FI é o único alimento ofertado ao lactente, e devido a este fato, espera-se uma melhor conformidade à legislação vigente, tendo em vista que erros na composição e/ou informações veiculadas na rotulagem podem acarretar em sérios problemas de saúde aos lactentes que fazem uso dessas fórmulas. No entanto, contrariando essa expectativa, todos os produtos analisados apresentaram alguma não-conformidade.

O maior percentual de inadequações foi em relação aos itens que diziam respeito a aspectos sobre a designação dos produtos. Dentre as amostras selecionadas, 80% delas não apresentaram clareza quanto ao tipo de leite utilizado na formulação, contrariando o que diz as RDCs que ressaltam a importância da clareza sobre a composição do produto (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b). A falta de clareza sobre a origem da fonte proteica caracteriza risco para crianças alérgicas. A alergia à proteína do leite de vaca é uma doença inflamatória que acomete principalmente o trato gastrointestinal e a pele, ocorrendo de forma secundária à reação imunológica contra algumas proteínas presentes no LV, principalmente a β -Lg e a CN, alérgenos alimentares mais frequentes no grupo etário até os dois anos de idade (ALVES & MENDES, 2013). Diante deste aspecto observamos que os resultados para este tipo de inadequação foram semelhantes ao observado por outros autores. No estudo realizado por Rocha (2016), os itens que tiveram maior número de inadequações foram os que versavam sobre a designação do produto em relação à fonte proteica, apresentando não conformidade em 50% das FIs analisadas, sendo o item com maior número de fórmulas inadequadas.

Vem sendo registrado um crescente aumento de crianças com alergia à proteína do LV, cuja prevalência é de 2 a 7,5% em lactentes alimentados com FIs. Omissões relativas à origem da proteína da fórmula podem levar à aquisição ou indicação incorreta do produto, o que possivelmente poderia causar danos em lactentes com algum tipo de intolerância e/ou alergia à proteína do mesmo (LINS et al., 2011; ROMERO et al., 2014). Em um estudo desenvolvido por ROMERO e colaboradores (2014) no qual fez um levantamento com familiares de crianças com alergia à proteína do LV apontou que 39,5% das reações alérgicas relatadas estavam relacionadas a erros na leitura dos rótulos e que somente 1, dos 52 participantes, conseguiu identificar corretamente todos os produtos industrializados que apresentavam LV, dentre as embalagens apresentados no estudo. Este resultado reforça o argumento de que é extremamente importante a apresentação da fonte de proteína do produto de forma clara no rótulo, a fim de evitar complicações a esses pacientes.

Inadequações também foram encontradas em algumas marcas de FIs em relação às informações sobre as características essenciais de composição e qualidade das FIs,

principalmente em relação aos teores de nutrientes por kcal ou kJ na maioria das marcas, em que os nutrientes só foram expressos em 100 g ou 100 mL do produto. O teor de Fe estava acima do limite máximo recomendado, mas apenas em uma das amostras (NN1), no entanto, quando calculada a ingestão diária para o Fe nas amostras, nenhuma das marcas demonstrou apresentar risco de efeitos adversos à saúde em relação a este mineral, uma vez que não ultrapassaram o limite tolerável. Vale ressaltar que o Fe é um mineral com necessidade nutricional mínima até os seis meses de idade (0,27 mg/dia) (TRUMBO, 2001). Outra inadequação encontrada foi referente proporção de ARA/DHA. Esses ácidos graxos deverão ser regulados pelos níveis máximos, uma vez que concentrações excessivas não são benéficas e podem ter efeitos prejudiciais, e, além disso, deve haver um equilíbrio adequado entre ARA e DHA (KOLETZKO et al., 2012). Neste estudo, o conteúdo de ARA nas amostras ME1, ME2, DA1 e DA2 estavam em maior concentração em relação ao DHA. É importante observar que, independentemente da mistura de gordura usada, DHA e ARA são adicionados como ingredientes opcionais às FIs (KOLETZKO, 2016; LIEN et al., 2018). No entanto, em FIs comercializadas em países europeus, a adição de DHA (20-50 mg/100mL) agora é obrigatória (HUËROU-LURON et al., 2018). Segundo o CODEX (2003), a fonte de gordura utilizada para suplementar as FIs devem ser consideradas, porque alguns países proíbem expressamente o óleo de algodão e gergelim e os óleos de gorduras hidrogenadas. As condições para o uso de óleo de peixe em fórmulas também foram sugeridas como uma questão que merece discussão. Assim, dados os benefícios gerais de DHA e de ARA, a suplementação infantil pode melhorar os resultados neurológicos, especialmente em populações vulneráveis. No entanto, a composição ideal do suplemento e as estratégias de dosagem e tratamento ainda precisam ser determinadas para facilitar a suplementação de rotina.

Outro parâmetro analisado que não está em conformidade com a lei estava relacionado às informações e orientações. Informações referentes às advertências sobre os riscos do preparo inadequado e às instruções para o correto preparo do produto, incluindo medidas de higiene e dosagens para diluição estavam presentes em todos os rótulos. No entanto, 80% das marcas avaliadas apresentaram a figura de uma mamadeira na ilustração de como preparar a fórmula e 40%, a figura de um ninho de pássaros com filhotes sendo alimentados por sua mãe logo abaixo da logomarca. O Decreto nº 8.552/2015 que regulamenta a comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância abrange, além das FIs e outros alimentos destinados a crianças, utensílios usados para ofertá-los, como bicos, mamadeiras e chupetas, proibindo o uso de ilustrações desses utensílios nos rótulos (BRASIL, 2015b). Quando necessário oferecer FIs,

recomenda-se o uso de copinhos destinados a este fim. Acredita-se que o uso do copo previne o contato precoce do bebê com outros bicos que não o do peito da mãe (MATALOUN, et al., 2004; SILVA et al., 2008). Já a RDC n° 222/2002 está relacionada à promoção comercial e às orientações de uso de alimentos voltados para alimentação infantil, e proíbe o uso de ilustrações, fotos ou outras representações gráficas de lactentes, crianças pequenas ou figuras humanizadas. Esta recomendação é uma forma de aumentar o controle da publicidade em torno dos substitutos do LM e de objetos que possam estimular o desmame precoce (BRASIL, 2015). Outros estudos como o de Abrantes & Tabai (2013), Pereira & Silva (2017) e Silva et al. (2008), também identificaram inadequações quanto a presença de desenhos e representações gráficas desnecessárias em 92%, 57,9% e 63,5% das FIs avaliadas, respectivamente.

Observou-se também que o conteúdo declarado no rótulo dos diferentes lotes tinha exatamente o mesmo valor, indicando assim que foi utilizado o mesmo rótulo para os diferentes lotes. No entanto, os valores obtidos experimentalmente revelaram que no caso da proteína total e dos minerais avaliados, os valores não foram exatamente iguais entre si, pressupondo que os fabricantes não levaram em consideração o fato da composição nutricional entre os lotes tenderem a serem diferentes. Isto deveria estar claramente declarado no rótulo.

6 CONCLUSÃO

Embora as FIs sejam atualmente muito mais seguras e nutricionalmente mais aprimoradas do que eram há décadas atrás, o LM continua sendo a melhor fonte de nutriente, capaz de satisfazer plenamente as necessidades do lactente. Apesar das inúmeras tentativas dos fabricantes, bem como de especialistas na área de nutrição infantil em mimetizar a composição ou desempenho do LM, não é possível afirmar que os nutrientes presentes nas FIs possuem a mesma qualidade, visto que de acordo com os resultados obtidos em estudos clínicos, ainda persistem as diferenças no desenvolvimento entre lactentes amamentados exclusivamente e aqueles alimentados com FIs.

De acordo com os dados apresentados neste estudo, não houve variação entre as FIs no que diz respeito ao conteúdo total de proteínas, entretanto, observou-se grande variabilidade no conteúdo referente às frações proteicas (Lf, α -CN, β -CN, κ -CN, β -Lg e α -La) e em relação à composição de aminoácidos essenciais, tanto entre as FIs de fase 1 e de fase 2, quanto entre seus lotes, o que em grande parte pode ser devido a variações causadas pela individualidade na composição geral do LV (raça, alimentação, sazonalidade, condições e efeitos do processamento) utilizado na elaboração destas FIs.

Com relação à avaliação da qualidade das proteínas, apesar do seu conteúdo total estar acima ou igual ao valor considerado ideal, quando analisada a concentração dos aminoácidos essenciais nas amostras, embora todos tenham sido identificados, estava muito abaixo da quantidade presente no LM (valor de referência). A baixa concentração encontrada explica o motivo do escore químico de aminoácidos, bem como o PDCAAS, estarem abaixo de 1,0. Sendo assim, pode-se dizer que se trata de uma fonte proteica deficiente em aminoácidos essenciais, uma vez que vários aminoácidos foram limitantes. Pressupõe-se que a baixa concentração de aminoácidos essenciais seja devido ao fato de que o valor obtido experimentalmente para α -La (proteína esta de elevado valor biológico) também tenha sido baixo nas FIs. Vale ressaltar que a atual norma brasileira não contém requisitos específicos sobre a qualidade das proteínas nas FIs.

As diferenças nas quantidades relativas de proteínas do soro contidas no LM e no LV são muito grandes, como observado neste estudo. Uma abordagem alternativa consistiria em aumentar a concentração de α -La no LV usando a tecnologia de fracionamento. No entanto, atualmente esta alternativa ainda não é viável para a maioria dos fabricantes de FIs. Em última análise, a estratégia de modificar e/ou adaptar a composição é prejudicada pela heterogeneidade

na composição específica das proteínas do soro. Mesmo com o conhecimento dos benefícios provenientes de compostos bioativos como o da α -La e da Lf, estes ingredientes considerados opcionais não estão explicitamente previstos nos regulamentos técnicos como uma alternativa para melhorar a composição de aminoácidos essenciais. O padrão atual apenas afirma que aminoácidos essenciais e semi-essenciais podem ser adicionados para melhorar a qualidade da proteína nas formulações, o que parece ser a alternativa mais acessível para melhorar o valor biológico das FIs.

Com relação à conformidade dos rótulos, a maior preocupação foi a falta da descrição correta sobre o tipo de leite utilizado na formulação. Esta informação deveria estar descrita na parte frontal dos rótulos. A falta de clareza sobre a origem da fonte proteica do produto caracteriza risco às crianças com alergia aos componentes do LV.

De forma geral, desconsiderando algumas exceções, a maioria das FIs avaliadas atenderam às recomendações de ingestão diária para os minerais essenciais, bem como aos limites mínimos e máximos estabelecidos pela legislação brasileira. Além disso, os valores encontrados experimentalmente foram similares aos valores declarados nos respectivos rótulos. Em relação aos metais potencialmente tóxicos, os resultados da avaliação de risco mostraram que as FIs são seguras em termos de Hg, As, Cd, Pb e U. Entretanto, maior atenção deve ser dada às FIs ao longo de sua produção, a fim de limitar a contaminação por Al e Sn, especialmente porque foi detectada a presença destes metais em grande parte das FIs.

Este estudo permitiu concluir que existe a necessidade de se ampliar o conhecimento acerca da qualidade da fonte proteica utilizada na elaboração das FIs comercializadas no Brasil, uma vez que foi identificado uma carência de estudos científicos avaliando o valor biológico destas formulações. Ademais, é necessário ampliar a fiscalização dessas fórmulas não apenas no que tange à qualidade nutricional e às informações na rotulagem, mas também quanto à contaminação por metais tóxicos, especialmente em relação ao excesso de Al que tem sido constantemente identificado nas FIs.

REFERÊNCIAS

- ABDULLA, M.; CHIMIECLNICKA, J. New aspects on the distribution and metabolism of essential trace elements after dietary exposure toxic metals. **Biological Trace Element Research**, v. 23, n. 2, p. 25—53, 1990.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6665 – **Folhas laminadas de aço-carbono revestidas eletroliticamente com estanho ou cromo ou não revestidas**. São Paulo: ABNT, 2006
- AGOSTONI, C.; BRAEGGER, C.; DECSI, T.; KOLACEK, S.; KOLETZKO, B. et al. Role of dietary factors and food habits in the development of childhood obesity: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 52, p. 662—669, 2011. doi:10.1097/mpg.0b013e3182169253
- AHMED, A. A.; MOHAMMED, E. E.; AMIN, M.; ABDEL-RAHEEM, D.A. Aluminum level in infants' powdered milk based formulae. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v. 6, p. 104—107, 2016.
- AKHTAR, S.; ISMAIL, T.; RIAZ, M.; SHAHBAZ, M.; AMIN, K. Minerals and heavy metals in raw and ultra heat treated commercial milks in Pakistan. **International Journal of Food and Allied Sciences**, v. 1, n. 1, p. 18—24, 2015. doi:http://dx.doi.org/10.21620/ijfaas.2015118-24
- ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; LAGARDA, M. J.; LÓPEZ, J. C. Amino acid contents of infant formulas. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 12, n. 2, p. 137—146, 1999. doi:10.1006/jfca.1999.0818
- ALMEIDA, C. C.; ALVARES, T. S.; COSTA, M. P.; CONTE-JUNIOR, C. A. protein and amino acid profiles of different whey protein supplements. **Journal of Dietary Supplements**, v. 12, n. 3, p. 313—323, 2015a.
- ALMEIDA, C. C.; CONTE-JÚNIOR, C. A.; SILVA, A. C. O.; ALVARES, T. S. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 1840—1854, 2013. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013a/agrarias/proteina%20do%20soro.pdf>
- ALMEIDA, C. C.; MONTEIRO, M. L. G.; CARNEIRO DA COSTA-LIMA, B. R.; ALVARES, T. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. **Food Science and Technology**, v. 61, p. 7—11, 2015b.
- ALMEIDA, C. C.; PEREIRA, B. F. M.; LEANDRO, K. C.; COSTA, M. P.; SPISSO, B. F.; CONTE-JUNIOR, C. A. Bioactive compounds in infant formula and their effects on infant nutrition and health: a systematic literature review. **International Journal of Food Science**, v. 2021, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8850080>
- ALVES, J. Q. N.; MENDES, J. F. R. Consumo dietético e estado nutricional em crianças com alergia à proteína do leite de vaca. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 24, n. 1, p. 65—72, 2013.

ANASTASIO, A.; CAGGIANO, R.; MACCHIATO, M.; PAOLO, C.; RAGOSTA, M.; PAINO, S.; CORTESI, M. L. Heavy metal concentrations in dairy products from sheep milk collected in two regions of southern Italy. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 47, n. 1, p. 69—73, 2006. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-47-69>

AOAC. **Association of Official Agricultural Chemists Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, 1994.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official Method 972.32 (16.5.11). In: Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International. 19. ed. Maryland: AOAC, 2012.

APP. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Policy Statement: Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 129, p. e827—841, 2012. doi:<https://doi.org/10.1542/peds.2011-3552>

ARAGAO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476—2481, 2009.

ATIYA, A. M., STRANDVIK, B., SABEL, K. G., PALME, K. C., STRÖMBERG, R., AND YNGVE, A. Polyamine levels in breast milk are associated with mothers' dietary intake and are higher in preterm than full-term human milk and formulas. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 27, p. 459—467, 2014. doi:10.1111/jhn.12156

ATSDR. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**. Toxicological profile for tin and tin compounds. 2005. Disponível em:

AUMEISTERE, L.; CIPROVIČA, I.; ZAVADSKA, D.; BAVRINS, K.; BORISOVA, A. Zinc content in breast milk and its association with maternal diet. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1438, 2018. doi:10.3390/nu10101438

BAIRD, C. **Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 49—74, 2013. doi:10.1016/j.pcl.2012.10.002

BALTHAZAR, C. F.; PIMENTEL, T. C.; FERRAO, L. L.; ALMADA, C. N.; SANTILLO, A. et al. Sheep Milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, p. 247—262, 2017.

BARGELLINI, A.; VENTURELLI, F.; CASALI, E.; FERRARI, A.; MARCHESI, I.; BORELLA, P. Trace elements in starter infant formula: dietary intake and safety assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 3, p. 2035—2044, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8290-9>

BAXTER, M.J.; BURRELL, J. A.; CREWS, H.; MASSEY, R. C. Aluminium levels in milk and infant formulas. **Food Additives Contaminants**, v. 8, p. 653—660, 1991.

BERGMANN, H.; RODRÍGUEZ, J. M.; SALMINEN, S.; SZAJEWSKA, H. Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report. **British Journal of Nutrition**, v. 112, p. 1119—1128, 2014. doi:10.1017/S0007114514001949

BINGHAM, E.; COHRSEN, B. **Patty's Toxicology**. Wiley. 2012

BJELAKOVIC, L.; KOCIC, G.; BJELAKOVIC, B.; NAJMAN, S.; STOJANOVIĆ, D.; JONOVIC, M.; POP-TRAJKOVIC, Z. Polyamine oxidase and diamine oxidase activities in human milk during the first month of lactation. **Iranian Journal of Pediatrics**, v. 22, n. 2, p. 218—222, 2012.

BLANCO, A.; BRESSANI, R. Biodisponibilidad de aminoácidos in el frijol (*Phaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, v. 41, n. 1, p. 38—51, 1991.

BLOCK, R. J.; MITCHELL, H. H. The correlation of amino acid composition of protein with their nutritive value. **Nutrition Abstracts and Reviews**, v. 16, p. 249—278, 1946.

BOBE, G.; BEITZ, D. C.; FREEMAN, A. E.; LINDBERG, G. L. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 458—463, 1998.

BODE L. The functional biology of human milk oligosaccharides. **Early Human Development**, v. 91, n. 11, p. 619—622, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>

BODE, L.; JANTSCHER-KRENN, E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. **Advances in Nutrition**. v. 3, n. 3, 383S—391S, 2012.

BOESTEN, R.; SCHUREN, F.; BEN AMOR, K.; HAARMAN, M.; KNOL, J.; DE VOS, W. M. Bifidobacterium population analysis in the infant gut by direct mapping of genomic hybridization patterns: potential for monitoring temporal development and effects of dietary regimens. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 417—427, 2011. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00216.x

BONDY, S. C. Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration. **Neurotoxicology**, v. 52, p. 222—229, 2016. doi: 10.1016/j.neuro.2015.12.002.

BONFATTI, V.; GRIGOLETTO, L.; CECCHINATO, A.; GALLO, L.; CARNIER, P. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, n.1-2, p. 101—106, 2008. doi:10.1016/j.chroma.2008.04.075

BOSE-O'REILLY, S.; MCCARTY, K. M.; STECKLING, N.; LETTMEIER, B. Mercury exposure and children's health. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 40, p. 186—215, 2010. doi: 10.1016/j.cppeds.2010.07.002

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248—254, 1976.

BRAEGGER, C.; CHMIELEWSKA, A.; DECSI, T.; KOLACEK, S.; MIHATSCH, W.; MORENO, L.; PIESCIK, M.; PUNTIS, J.; SHAMIR, R.; SZAJEWSKA, H.; TURCK, D.; VAN GOUDOEVER, J. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 52, p. 238—250, 2011.
doi:10.1097/mpg.0b013e3181fb9e80

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos métodos analíticos. Brasília, 2003a. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC n° 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 26 dez. 2003b. Seção 1, n. 251. p. 33—34.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC n° 43, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes, 2011a. Disponível em: http://www.ibfan.org.br/site/wp-content/uploads/2014/06/Resolucao_RDC_n_43_de_19_de_setembro_de_2011.pdf

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC n° 44, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância, 2011b. Disponível em: http://www.ibfan.org.br/site/wp-content/uploads/2014/06/Resolucao_RDC_n_44_de_19_de_setembro_de_2011.pdf

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC n° 45, de 25 de setembro de 2014. Dispõe sobre o regulamento técnico de compostos de nutrientes para alimentos destinados a lactentes e a crianças de primeira infância, 2014b. Disponível em: http://www.poderesaude.com.br/novosite/images/stories/publicacoes_29.09.2014-II.pdf

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC n° 48, de 25 de setembro de 2014. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas, 2014a. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0048_25_09_2014.html

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC n° 88, de 26 de março de 2021. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos, 2021. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-88-de-26-de-marco-de-2021-311655598>

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Carências de micronutrientes. Cadernos de atenção básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cadernos_atencao_basica_carencias_micronutrientes.pdf

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Manual de condutas gerais do programa nacional de suplementação de vitamina A. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2013a. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_condutas_suplementacao_vitamina_a.pdf

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Programa Nacional de Suplementação de Ferro: manual de condutas gerais. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2013b. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_suplementacao_ferro_condutas_gerais.pdf

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica (2. ed.) – Brasília: Ministério da Saúde, 2015a. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_crianca_aleitamento_materno_cab23.pdf

BRENNAN, J. T.; VARAMINI, B.; JENSEN, R. G.; DIERSEN-SCHADE, D. A.; BOETTCHER, J. A.; ARTERBURN, L. M. Docosaehexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 1457—1464, 2007.

BURRELL, S.A.; EXLEY, C. There is (Still) Too Much Aluminium in Infant Formulas. **BMC Pediatrics**, v. 10, p. 63, 2010.

BUTTS, C.; HEDDERLEY, D.; HERATH, T.; PATURI, G.; GLYN-JONES, S.; WIENS, F.; et al. human milk composition and dietary intakes of breastfeeding women of different ethnicity from the manawatu-wanganui region of New Zealand. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1231, 2018. doi:10.3390/nu10091231

BÜYÜKUSLU, N. Polyamines in human breast milk. **Journal of Current Pediatrics**, v. 13, p. 122—126, 2015. doi:10.4274/jcp.44227

CALIL, V. M. L. T.; FALCÃO, M. C. Composição do leite humano: o alimento ideal. **Revista de Medicina**, v. 82, n. 1-4, p. 1—10, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v82i1-4p1-10>

CAMPOS-GIMÉNEZ, E.; BÉNET, S.; OGUEY, Y.; MARTIN, F.; REDEUIL, K. The contribution of minor folates to the total vitamin B9 content of infant formula and clinical nutrition products. **Food Chemistry**, v. 249, p. 91—97, 2017. doi:10.1016/j.foodchem.2017.12.061

CAO, X.; ZHENG, Y.; WU, S.; YANG, N.; YUE, X. Characterization and comparison of milk fat globule membrane N-glycoproteomes from human and bovine colostrum and mature milk. **Food & Function**, v. 10, p. 5046—5058, 2019. doi:10.1039/c9fo00686a

CARIGNAN, C. C.; KARAGAS, M. R.; PUNSHON, T.; GILBERT-DIAMOND, D.; COTTINGHAM, K. L. Contribution of breast milk and formula to arsenic exposure during the first year of life in a US prospective cohort. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v. 26, n. 5, p. 452—457, 2015.

<https://doi.org/10.1038/jes.2015.69>

CASTILHO, S. D.; BARROS FILHO, A. A. Alimentos utilizados ao longo da história para nutrir lactentes. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 3, p. 179—188, 2010.

CASTRO, C. S. P. D.; ARRUDA, A. F.; CUNHA, L. R. D.; SOUZA, J. R.; BRAGA, J. W. B., & DÓREA, J. G. Toxic metals (Pb and Cd) and their respective antagonists (Ca and Zn) in infant formulas and milk marketed in Brasilia, Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n.11, p. 4062—4077, 2010.

<https://doi.org/10.3390/ijerph7114062>

CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 8, p. 566—575, 2011.

<https://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302011000800010>

CAVAGNI, G.; PAGANELLI, R.; CAFFARELLI, C.; D'OFFIZI, G. P.; BERTOLINI, P.; AIUTI, F.; GIOVANNELLI, G. Passage of food antigens into the circulation of breast-fed infant. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 61, p. 361—365, 1985.

CAVALETTO, M.; GIUFFRIDA, M. G.; CONTI, A. A abordagem proteômica da análise da membrana do glóbulo de gordura do leite humano. **Clinica Chimica Acta**, v. 347, n. 1-2, p. 41—48, 2004.

CAVALETTO M.; GIUFFRIDA M.G.; CONTI A. (2008) Milk Fat Globule Membrane Components—A Proteomic Approach. In: BÖSZE Z. (eds) **Bioactive Components of Milk. Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol 606. Springer, New York, NY.

https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4_4

CHANG, C. Y.; KE, D. S.; CHEN, J. Y. Essential fatty acids and human brain. **Acta Neurologica Taiwan**, v. 18, n.4, p. 231—41, 2009. doi:10.1007/bf02859265

CHOI, J.; CHANG, J.; HONG, J.; SHIN, S.; PARK, J.; OH, S. Low-level toxic metal exposure in healthy weaning-age infants: association with growth, dietary intake, and iron deficiency. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 4, p. 388, 2017.

CHUCHU, N.; PATEL, B.; SEBASTIAN, B.; EXLEY, C. O teor de alumínio das fórmulas infantis continua muito alto. **BMC pediatrics**, v. 13, p. 162, 2013.

<https://doi.org/10.1186/1471-2431-13-162>

COCCO, R. R.; SOUZA F. S.; SARNI, R. O. S.; MALLOZI, M. C.; SOLÉ, D. O papel da nutrição no primeiro ano de vida sobre a prevenção de doenças alérgicas. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 32, n. 2, p. 68—71, 2009.

CODEX. **Codex Alimentarius International Food Standards**. Contaminants. 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faowho-codexalimentarius/thematic-areas/contaminants/en/>.

CODEX. **Codex Alimentarius International Food Standards**. Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants (Codex Stan 72/1981). Revisado em 2007. Disponível em: http://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

CONCHA, G.; ENEROTH, H.; HALLSTRÖM, H.; SAND, S. **Contaminants and minerals in foods for infants and young children. Part 2: Risk and benefit assessment**. Swedish Food Agency, 2013.

COPPA, G. V.; GABRIELLI, O.; PIERANI, P.; CATASSI, C.; CARLUCCI, A.; GIORGI, P. L. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. **Pediatrics**, v. 91, n. 3, p. 637—641, 1993.

CORKINS, K. G.; SHURLEY, T. What's in the bottle? A review of infant formulas functional ingredients in infant formulas standard cow's milk – based term infant formula. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 31, p. 723—729, 2016.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri: Manole, 2005. 878p.

CRAIG, W. J. Health effects of vegan diets. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 1627S—1633S, 2009.

CRIDER, K. S.; BAILEY, L. B.; BERRY, R. J. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. **Nutrients**, v. 3, n. 3, p. 370—84, 2011. doi:10.3390/nu3030370

CRUZ, A. G. et al. **Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

CZEIZEL, A. E.; DUDÁS, I.; VERECZKEY, A.; BÁNHIDY, F. Folate deficiency and folic acid supplementation: The prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. **Nutrients**, 5, 4760—4775, 2013. doi:10.3390/nu5114760

DABEKA, R.; FOUQUET, A.; BELISLE, S.; TURCOTTE, S. Lead, cadmium and aluminum in Canadian infant formulae, oral electrolytes and glucose solutions. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 6, p. 744—753, 2011. <https://doi.org/10.1080/19393210.2011.571795>

DARRAGH, A. J.; MOUGHAN, P. J. The effect of hydrolysis time on amino acid analysis. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 3, p. 888—893, 2005.

DAWODU, A.; ZALLA, L.; WOO, J. G.; HERBERS, P. M.; DAVIDSON, B. S.; HEUBI, J. E.; MORROW, A. L. Heightened attention to supplementation is needed to improve the vitamin D status of breastfeeding mothers and infants when sunshine exposure is restricted. **Maternal & Child Nutrition**, v.10, n. 3, p. 383—397, 2014. doi:10.1111/j.1740-8709.2012.00422.x

DELPLANQUE, B.; GIBSON, R.; KOLETZKO, B.; LAPILLONNE, A.; STRANDVIK, B. Lipid quality in infant nutrition: current knowledge and future opportunities. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 61, n.1, p. 8—17, 2015. doi:10.1097/mpg.0000000000000818

DEMMELMAIR, H.; PRELL, C.; TIMBY, N., et al: Benefits of lactoferrin, osteopontin and milk fat globule membranes for infants. **Nutrients**, v. 9, p. E817, 2017.

DEWETTINCK, K.; ROMBAUT, R.; THIENPONT, N.; LE, T. T.; MESSENS, K.; VAN CAMP, J. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 436—457, 2008.

DONATO, L.; ALEXANDER, M.; Dalgleish, D.G. Acid gelation in heated and unheated milks: interactions between serum protein complexes and the surfaces of casein micelles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4160—4168, 2007. doi:10.1021/jf063242c

DONOVAN, S. M.; GERMAN, J. B., LÖNNERDAL, B., LUCAS, A. **Human Milk: composition, clinical benefits and future opportunities**. Nestlé Nutr Inst Workshop Ser. Nestlé Nutrition Institute, Switzerland/S. Karger A G., Basel, v. 90, p. 93—101, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000490298>

DRAČKOVÁ, M.; BORKOVCOVÁ, I.; JANŠTOVÁ, B.; NAISEROVÁ, M.; PŘIDALOVÁ, H.; et al. Human milk polyunsaturated logcahin fatty acids and secretory immunoglobulin: an antibodies and early childhood allergy. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 11, p. 29—39, 2000.

DRUET, C.; STETTLER, N.; SHARP, S.; SIMMONS, R. K.; COOPER, C et al. Prediction of childhood obesity by infancy weight gain: an individual-level meta- analysis. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 26, p. 19—26, 2012.

DUPONT, C. Protein requirements during the first year of life. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1544S—1549S, 2003. doi:10.1093/ajcn/77.6.1544s

DURUIBE, J. O.; OGWUEGBU, M. O. C.; EGWURUGWU, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Sciences**, v. 2, n. 5, p. 112—118, 2007.

EC. **European Commission**. Commission Directive 2006/141/EC of 22 December 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC. Official Journal of the European Union, 2006. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/dir/2006/141/oj>

EFSA. **European Food Safety Authority**. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Draft scientific opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae released for public consultation. **EFSA Journal**, v. 12, n. 7, p. 3760, 2014. doi:10.2903/j.efsa.2014.3760

EPA. **United States Environmental Protection Agency**. Aluminum phosphide. CASRN 20859-73-8. DTXSID1023867, 2008. Disponível em: https://iris.epa.gov/ChemicalLanding/&substance_nmbr=5

ERICK, M. Breast milk is conditionally perfect. **Medical Hypotheses**, v. 111, p. 82—89, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.12.020>

ESPGHAN COMMITTEE ON NUTRITION; AGOSTONI, C.; BRAEGGER, C. et al. Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 49, p. 112—125, 2009. doi:10.1097/01.mpg.0000304464.60788.bd.

EUCLYDES, M. P. **Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação saudável**. 3. ed. Viçosa: s.e. 2005.

EXLEY, C. The toxicity of aluminium in humans. **Morphologie**, v. 100, n. 329, p. 51—55, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2015.12.003>

EXLEY, C.; BIRCHALL, J.D. The Cellular Toxicity of Aluminium. **Journal of Theoretical Biology**, v. 159, p. 83—98, 1992.

FAGUNDES, M.M.A.; VIANA, A.M.F.; CARVALHO, M.M.F., SILVA, M.E. Evaluation of the biological quality of defatted pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) seed flour protein supplemented with lysine to rats (*Rattus norvegicus*). **Revista de Nutrição**, v. 32, p. e180129, 2019. <https://doi.org/10.1590/1678-9865201932e180129>

FAIRBROTHER, A.; WENSTEL, R.; SAPPINGTON, K.; WOOD, W. Framework for metals risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, n. 2, p. 145—227, 2007. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.03.015

FANNI, D.; AMBU, R.; GEROSA, C.; NEMOLATO, S.; IACOVIDOU, N.; ANEYKEN, P. et al. Aluminum exposure and toxicity in neonates: A practical guide to halt aluminum overload in the pre natal and perinatal periods. **World Journal of Pediatrics**, v. 10, n. 2, p. 101—107, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12519-014-0477-x>

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAO Expert Consultation. Auckland: New Zealand, 2013.

FAO. **Food and Drug Administration**. Amendment of regulations on parenteral nutrition; delay of effective date. Fed Register 68, 32979—32981, 2003.

FDA. **Food and Drug Administration**. Current good manufacturing practices, quality control procedures, quality factors, notification requirements, and records and reports, for infant formula. Regulatory impact analysis for final rule. Federal Register. United States: FDA, 2014. Disponible em: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2014-06-10/pdf/2014-13384.pdf>

FERGUSON, E.; CHEGE, P.; KIMIYWE, J.; WIESMANN, D.; HOTZ, C. Zinc, iron and calcium are major limiting nutrients in the complementary diets of rural Kenyan children. **Maternal and Child Nutrition**, v. 11, suppl. 3, p. 6—20, 2015. doi:10.1111/mcn.12243.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, n. 11, p. 751—760, 2009. doi:10.1016/j.nutres.2009.09.016

FEWTRELL, M. S.; EDMONDS, C. J.; ISAACS, E.; BISHOP, N. J.; LUCAS, A. Aluminium Exposure from Parenteral Nutrition in Preterm Infants and Later Health Outcomes during Childhood and Adolescence. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 70, p. 299—304, 2011.

FEWTRELL, M.; BRONSKY, J.; CAMPOY, C.; DOMELLÖF, M.; EMBLETON, N. et al. Complementary Feeding: A Position Paper by the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN). **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 64, n. 1, p. 119—132, 2017. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001454>

FLEDDERMANN, M.; DEMMELMAIR, H.; GROTE, V.; NIKOLIC, T.; TRISIC, B.; KOLETZKO, B. Infant formula 1602 composition affects energetic efficiency for growth: the BeMIM study, a randomized controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 33, p. 588—595, 2014. doi:https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.12.007

FOMON, S. J.; ZIEGLER, E. E.; NELSON, S. E. Erythrocyte incorporation of ingested ⁵⁸Fe by 56-day-old breast-fed and formula-fed infants. **Pediatric Research**, v. 33, p. 573—576, 1993.

FONTECHA, J.; BRINK, L.; WU, S.; POULIOT, Y.; VISIOLI, F.; JIMÉNEZ-LORES, R. Sources, production, and clinical treatments of milk fat globule membrane for infant nutrition and well-being. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1607, 2020.

FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, H.-W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 826, n. 2, p. 109—134, 1998. doi:10.1016/s0021-9673(98)00721-3

FUROTA, S.; OGAWA, N. O.; TAKANO, Y.; YOSHIMURA, T.; OHKOUCHI, N. Quantitative analysis of underivatized amino acids in the sub- to several-nanomolar range by ion-pair HPLC using a corona-charged aerosol detector (HPLC-CAD). **Journal of Chromatography B**, v. 095, p. 191—197, 2018. doi:10.1016/j.jchromb.2018.07.033

GABRIELLI, O.; ZAMPINI, L.; GALEAZZI, T.; PADELLA, L.; SANTORO, L.; PEILA, C.; COPPA, G. V. et al. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. **Pediatrics**, v. 128, n. 6, p. e1520—e1531, 2011. doi:10.1542/peds.2011-1206

GAMACHE, P. H.; MCCARTHY, S. M.; FREETO, S. M.; ASA, D. J.; WOODCOCK, M. J.; LAWS, K.; COLE, R. O. HPLC analysis of nonvolatile analytes using charged aerosol detection. **LC GC North America** **23**, p. 150—161, 2005.

GARCIA, C. P.; CARDOSO, A. L.; CARNEIRO, J. D. A.; MACEDO, A. C. L. Deficiência de vitamina B12 em lactente alimentado com leite materno. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 25, n. 3, p. 264—266, 2009.

GARWOLIŃSKA, D.; NAMIEŚNIK, J.; KOT-WASIK, A.; HEWELT-BELKA, W. Chemistry of human breast milk – a comprehensive review of the composition and role of milk metabolites in child development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 1—72, 2018. doi:10.1021/acs.jafc.8b04031

GOEHRING, K. C.; KENNEDY, A. D.; PRIETO, P. A.; BUCK, R. H. direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e101692, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0101692

GOLINELLI, L. P.; DELAGUILA, E. M.; PASCHOALIN, V. M. F.; SILVA, J. T.; CONTE-JUNIOR, C. A. Functional aspect of colostrum and whey proteins in human Milk. **Journal of Human Nutrition and Food Science**, v. 2, n. 3, p. 1—9, 2014.

GOLKAR, A.; MILANI, J. M.; VASILJEVIC, T. Altering allergenicity of cow's milk by food processing for applications in infant formula. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 1, p. 159—172, 2019. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2017.1363156>

GÓMEZ-GALLEGO, C.; COLLADO, M. C.; ILO, T.; JAAKKOLA, U.-M.; BERNAL, M. J.; PERIAGO, M. J.; et al., Infant formula supplemented with polyamines alters the intestinal microbiota in neonatal BALB/cOlaHsd mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 11, p. 1508—1513, 2012. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.10.003

GÓMEZ-GALLEGO, C.; KUMAR, H.; GARCÍA-MANTRANA, I.; DU TOIT, E.; SUOMELA, J. P. LINDERBORG, K. M.; COLLADO, M. C. Breast milk polyamines and microbiota interactions: impact of mode of delivery and geographical location. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 70, n. 3, p. 184—190, 2017. doi:10.1159/000457134

GONÇALVES, N. A.; CECCHI, P. P.; VIEIRA, R. M.; SANTOS, M. D. A.; ALMEIDA, T. C. Rotulagem de alimentos e consumidor. **Nutrição Brasil**, v. 14, n. 4, 2015.

GONÇALVES, V. F.; TEIXEIRA, D. Q.; OLIVEIRA, P. F.; SOUSA, T. H. Mulheres soropositivas para o HIV: compreensão, sentimentos e vivência diante da maternidade. **Revista Brasileira Promoção Saúde**, Fortaleza, v. 26, n. 2, p. 281—289, 2013.

GOYER R. A. Toxic and essential metal interactions. **Annual Review of Nutrition**, v. 17, p. 37—50, 1997. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.17.1.37>

GREER, F. R. Do breastfed infants need supplemental vitamins? **Pediatric Clinics of North America**, v. 48, n. 2, p 415—423, 2001.

GROTE, V.; VERDUCI, E.; SCAGLIONI, S.; VECCHI, F.; CONTARINI, G.; GIOVANNINI, M.; KOLETZKO, B.; AGOSTONI, C.; EUROPEAN CHILDHOOD OBESITY PROJECT. Breast milk composition and infant nutrient intakes during the first 12 months of life. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 2, p. 250—256, 2015. doi:10.1038/ejcn.2015.162

GUO, M. **Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology**. 1 ed. Cambridge: Elsevier, 2014.

HALABI, A.; DEGLAIRE, A.; HENNETIER, M.; VIOLLEAU, F.; BUREL, A.; BOUHALLAB, S. et al. Structural characterization of heat-induced protein aggregates in model infant milk formulas. **Food Hydrocolloids**, v. 107, p. 105928, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105928>

HALL, W. L.; MILLWARD, D. J.; LONG, S. J.; MORGAN, L. M. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 2, p. 239—248, 2003.

HAMPEL, D.; DROR, D. K. ALLEN, L. H. Micronutrients in human milk: analytical methods. **Advances in Nutrition**, v. 9 (suppl 1), p. 313S—331S, 2018. doi:10.1093/advances/nmy017

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479—488, 2006.

HASCHKE, F.; HAIDEN, N.; THAKKAR, S. K.: Breastmilk: Nutritive and bioactive proteins. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 69, p. 17—26, 2016. doi:10.1159/000452820

HEGENAUER, J.; SALTMAN, P.; LUDWIG, D.; RIPLEY, L.; LEY, A. Iron-supplemented cow milk. Identification and spectral properties of iron bound to casein micelles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, p. 1294—1301, 1979.

HERMOSO, M.; VOLLHARDT, C.; BERGMANN, K.; KOLETZKO, B. Critical micronutrients in pregnancy, lactation, and infancy: considerations on vitamin d, folic acid, iron, and priorities for future research. **Annals of Nutrition and Metabolism**, 59(1), 5—9, 2011. doi:10.1159/000332062

HERNÁNDEZ, N. G.; ROBLES, G. A. L.; LÓPEZ, L. M. P. Importancia de la nutrición: primeiros 1,000 días de vida. **Acta Pediátrica Hondureña**, v. 7, n. 1, p. 597—607, 2016.

HERNELL, O. Human milk vs cow's milk and the evolution of infant formulas. **Nestle Nutrition Workshop Series Pediatric Program**, v. 67, p. 17— 28, 2011. doi:10.1159/000325572

HERNELL, O.; TIMBY, N.; DOMELLÖF, M.; LÖNNERDAL, B. Clinical benefits of milk fat globule membranes for infants and children. **The Journal of Pediatrics**, v. 173, p. S60—S65, 2016.

HOLLIS, B. W.; WAGNER, C. L. Assessment of dietary vitamin D requirements during pregnancy and lactation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 717—26. 2004.

HONG, S. J. Types of special infant formulas marketed in Korea and their indications. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition**, v. 21, n.3, p. 155, 2018.
<https://doi.org/10.5223/pghn.2018.21.3.155>

IBFAN. **International Baby Food Action Network**. Alimentação infantil. Bases fisiológica. São Paulo (SP): IBFAN Brasil e Instituto de Saúde, WHO, OPAS e UNICEF Brasil; 1994. p. 17—35. Disponível em: <http://www.ibfan.org.br/documentos/ibfan/doc-288.pdf>

ILSI BRASIL. **International Life Sciences Institute do Brasil**. Dinâmica da composição do leite humano e suas implicações clínicas. São Paulo: ILSI Brasil- International Life Sciences Institute do Brasil, 2018. (Série de publicações ILSI Brasil: força-tarefa de nutrição da criança; v. 8). Disponível em: <https://ilsibrasil.org/publication/dinamica-da-composicao-do-leite-humano-e-suas-implicacoes-clinicas/>

Institute of Medicine (US). **Dietary reference intakes. The essential guide to nutrient requirements**. Washington (DC): National Academy Press, 2006. Disponível em: https://www.nal.usda.gov/sites/default/files/fnic_uploads/DRIEssentialGuideNutReq.pdf

Institute of Medicine (US). **Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids**, 2000. National Academies Press (US).

Institute of Medicine (US). **Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes**. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997. National Academies Press (US).

JACOBI, S. K.; ODLE, J. Nutritional factors influencing intestinal health of the neonate. **Advances in Nutrition**, v. 3, n .5, p. 687—696, 2012. doi:10.3945/an.112.002683

JENSEN, R. Human milk lipids as a model for infant formulas. **Lipid Technology**, v. 3, p. 34—38, 1998.

JOHNSTON, W. H.; ASHLEY, C.; YEISER, M. et al. Growth and tolerance of formula with lactoferrin in infants through one year of age: double-blind, randomized, controlled trial. **BMC pediatrics**, v. 15, p. 173, 2015. doi:<https://doi.org/10.1186/s12887-015-0488-3>

KAMBE, T.; FUKUE, K.; ISHIDA, R.; MIYAZAKI, S. Overview of inherited zinc deficiency in infants and children. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 61, p. S44—S46, 2015. doi:10.3177/jnsv.61.s44

KAPAJ, S. et al. Human health effects from chronic arsenic poisoning: a review. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 41, p. 2399—2428, 2006.

KAZI, T. G.; JALBANI, N.; BAIG, J. A.; AFRIDI, H. I.; KANDHRO, G. A.; ARAIN, M. B.; JAMALI, M. K.; SHAH, A. Q. Determination of toxic elements in infant formulae by using

electrothermal atomic absorption spectrometer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 7, p. 1425—1429, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.03.025>

KAZI, T.G. et al. Evaluation of toxic elements in baby foods commercially available in Pakistan. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1313–1317, 2010

KEIKHA, M.; BAHREYNIAN, M.; SALEKI, M.; KELISHADI, R. Macro- and micronutrients of human milk composition: are they related to maternal diet? A comprehensive systematic review. **Breastfeeding Medicine**, v. 12, n. 9, p. 517—527, 2017. doi:10.1089/bfm.2017.0048.

KESSLER, H. G. **Food and bio process engineering: Dairy technology**. 5th revised and extended edition. München: Verlag A. Kessler, 2002.

KHAN, M. A.; KISSANA, A. S. Nutritional evaluation of some commercial baby foods consumed in Pakistan. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 1271—1274, 1985.

KOLETZKO, B. Human milk lipids. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 69, n. 2, p. 28—40, 2016. doi:10.1159/000452819

KOLETZKO, B.; AKERBLUM, H.; DODDS, P.; ASHWELL, M. Early nutrition and its later consequences: new opportunities. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 569, p. 1—12, 2005.

KOLETZKO, B.; LIEN, E.; AGOSTONI, C.; BÖHLES, H.; CAMPOY, C. et al. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 36, n. 1, p. 5—14, 2008. doi:10.1515/jpm.2008.001

KOLETZKO, B.; SHAMIR, R.; ASHWELL, M. Quality and safety aspects of infant nutrition. **Animal of Nutrition & Metabolism**, v. 60, p. 179—184, 2012. doi:10.1159/000338803

KOLETZKO, B.; VON KRIES, R.; MONASTEROLO, R. C.; SUBÍAS, J. E.; SCAGLIONI, S. et al. Infant feeding and later obesity risk. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 646, p. 15—29, 2009.

KREBS, N. F.; REIDINGER, C. J.; HARTLEY, S.; ROBERTSON, A. D.; HAMBIDGE, K. M. Zinc supplementation during lactation: effects on maternal status and milk zinc concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 1030—1036, 1995.

KUNZ, C.; MEYER, C.; COLLADO, M. C.; GEIGER, L.; GARCIA-MANTRANA, I.; BERTUA-RIOS, B.; MARTINEZ-COSTA, C.; BORSCH, C.; RUDLOFF, S. Influence of gestational age, secretor and Lewis blood group status on the oligosaccharide content of human milk. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. v. 64, n. 5, 789—798, 2017. doi:10.1097/mpg.0000000000001402 2016.

- KUS-YAMASHITA, M. M.; MANCINI FILHO, J. **Ácidos graxos: eicosapentaenoico (EPA) e docosaenoico (DHA)**. Série de publicações ILSI Brasil: funções plenamente reconhecidas de Nutrientes. São Paulo: ILSI Brasil-International Life Sciences Institute do Brasil, 2017.
- LACROIX, M.; BOS, C.; LÉONIL, J.; AIRINEI, G.; LUENGO, C.; DARÉ, S. et al. Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 5, p. 1070—1079, 2006. doi:10.1093/ajcn/84.5.1070
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680—685, 1970.
- LAVIALLE, M.; DENIS, I.; GUESNET, P.; VANCASSEL, S. Involvement of omega-3 fatty acids in emotional responses and hyperactive symptoms. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 10, p. 899—905, 2010.
- LE FEUNTEUN, F.; BARBÉ, D.; RÉMOND, O.; MÉNARD, Y.; LE GOUAR, D.; DUPONT, B.; LAROCHE. Impact of the dairy matrix structure on milk protein digestion kinetics: mechanistic modelling based on mini-pig in vivo data. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 4, p. 1099—1113, 2014. doi:10.1007/s11947-013-1116-6
- LE FEUNTEUN, S.; BARBÉ, F.; RÉMOND, D.; MÉNARD, O.; LE GOUAR, Y.; DUPONT, D.; LAROCHE, B. Impact of the Dairy Matrix Structure on Milk Protein Digestion Kinetics: Mechanistic Modelling Based on Mini-pig In Vivo Data. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 4, p. 1099—1113, 2013. doi:10.1007/s11947-013-1116-6
- LEE, H.; PADHI, E.; HASEGAWA, Y. et al. Compositional dynamics of the milk fat globule and its role in infant development. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, p. 313, 2018.
- LEVANDER O. Selenium requirements as discussed in the 1996 joint FAO/IAEA/WHO expert consultation on trace elements in human nutrition. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 10, p. 214—219, 1997.
- LIAO, Y.; ALVARADO, R.; PHINNEY, B.; Lönnerdal, B. Proteomic characterization of human milk whey proteins during a twelve-month lactation period. **Journal of Proteome Research**, v. 10, p. 1746—1754, 2011.
- LIAO, Y.; JIANG, R.; LÖNNERDAL, B. Biochemical and molecular impacts of lactoferrin on small intestinal growth and development during early life. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 90, p. 476—484, 2012.
- LIAO, Y.; WEBER, D.; XU, W.; DURBIN-JOHNSON, B. P.; PHINNEY, B. S.; LÖNNERDAL, B. Absolute quantification of human milk caseins and the whey/casein ratio during the first year of lactation. **Journal of Proteome Research**, v. 16, p. 4113—4121, 2017.
- LIEN, E. L. Infant formulas with increased concentrations of α -lactalbumin. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1555S—1558S, 2003.

- LIFSCHITZ, C. Early Life Factors Influencing the Risk of Obesity. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition**, v. 8, n. 4, p. 217—223, 2015. doi: <https://doi.org/10.5223/pghn.2015.18.4.217>
- LINS, M.; DAS, G. M.; HOROWITZ, M. R.; SILVA, G. A. P.; DA MOTTA, M. E. F. A. Oral food challenge test to confirm the diagnosis of cow's milk allergy. **The Journal of Pediatrics**, v. 86, n. 4, p. 285—289, 2011.
- LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interfaces Science**, Israel, v. 15, p. 73—83, 2010.
- LJUNG, K.; PALM, B.; GRANDÉR, M.; VAHTER, M. High concentrations of essential and toxic elements in infant formula and infant foods – a matter of concern. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 943—951, 2011. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.062
- LÖNNERDAL, B. Bioactive proteins in human milk: health, nutrition, and implications for infant formulas. **The Journal of Pediatric**, v. 173S, p. S4—S9, 2016. doi:10.1016/j.jpeds.2016.02.070
- LÖNNERDAL, B. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, p. 712S—717S, 2014.
- LÖNNERDAL, B. L.; HERNELL, O. An opinion on “staging” of infant formula: a developmental perspective on infant feeding. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 62, p. 9—21, 2014. doi:10.1097/mpg.0000000000000806
- LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77 n.6, p. 1537—1543, 2003. doi:10.1093/ajcn/77.6.1537S
- LÖNNERDAL, B. Preclinical assessment of infant formula. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 60, p. 196—199, 2012. doi:10.1159/000338209
- LÖNNERDAL, B.; ERDMANN, P.; THAKKAR, S. K., et al: Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.41, p. 1—11, 2017.
- LÖNNERDAL, B.; JIANG, R.; DU, X. Bovine lactoferrin can be taken up by the human intestinal lactoferrin receptor and exert bioactivities. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 53, p. 606—614, 2011.
- LÖNNERDAL, B.; KEEN, C. L.; HURLEY, L. S. Iron, copper, zinc and manganese in milk. **Annual Review of Nutrition**, v. 1, p. 149—174, 1981.
- LOPEZ, C.; MÉNARD, O. Human milk fat globules: polar lipid composition and *in situ* structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 29—41, 2011.

LOPEZ, F. A.; JUZWIAK, C. R. Temas de Nutrição em Pediatria: o uso de fórmulas infantis após o desmame. **Nestlé Nutrição**, n.74, 2003.

LUQUE, V.; CLOSA-MONASTEROLO, R.; ESCRIBANO, J.; FERRÉ, N. Early programming by protein intake: the effect of protein on adiposity development and the growth and functionality of vital organs. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 8, p. 49—56, 2015. doi:10.4137/nmi.s29525

MAATHUIS, A.; HAVENAAR, R.; HE, T.; BELLMANN, S. Digestão de proteínas e qualidade de fórmulas infantis de leite de cabra e vaca e leite humano em condições simuladas de bebês. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutricional**, v. 65, n. 6, p. 661—666, 2017. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001740>

MACÊDO, É. M. C.; AMORIM, M. A. F.; SILVA, A. C. S.; CASTRO, C. M. M. B. Efeitos da deficiência de cobre, zinco e magnésio sobre o sistema imune de crianças com desnutrição grave. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n. 3, p. 329—336, 2010. doi:10.1590/s0103-05822010000300012

MAISELS, M. J. Neonatal jaundice. **Pediatrics in Review**, v. 27, n. 12, p. 443—454, 2006. doi:10.1542/pir.27-12-443

MANONI, M.; DI LORENZO, C.; OTTOBONI, M.; TRETOLA, M.; PINOTTI, L. Comparative proteomics of milk fat globule membrane (MFGM) proteome across species and lactation stages and the potentials of MFGM fractions in infant formula preparation. **Foods**, v. 9, n. 9, p. 1251, 2020. doi:https://doi.org/10.3390/foods9091251

MARIN, A. H.; NEVES, C. V. A impossibilidade de amamentar em diferentes contextos. **Barbarói – Revista do departamento de ciências humanas e do departamento de psicologia**, v. 1, n. 38, p. 198—214, 2013.

MARTIN, C.; LING, P.-R.; BLACKBURN, G. Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula. **Nutrients**, v. 8, n. 5, p. 279, 2016. doi:10.3390/nu8050279

MARTIN, R.M.; HOLLY, J. M. P.; SMITH, G. D. et al. Could associations between breastfeeding and insulin-like growth factors underlie associations of breastfeeding with adult chronic disease? The Avon Longitudinal Study of Parents and Children. **Clinical Endocrinology**, v. 62, p. 728—737, 2005.

MARTINS, M. Z. Benefícios da amamentação para saúde materna. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente**, v. 1, n. 3, p. 87—97, 2013. <https://doi.org/10.17564/2316-3798.2013v1n3p87-97>

MATA, L.; PEREZ, M.; PUYOL, P.; CALVO, M. Distribution of added lead and cadmium in human and bovine milk. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 305—309, 1995.

MAVROUDI, A.; XINIAS, I. Dietary interventions for primary allergy prevention in infants. **Hippokratia Medical Journal**, v. 15, p. 216—222, 2011.

- MCCORMICK, D. B. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 426—426, 1999. doi:10.1093/ajcn/70.3.426
- MEHARG, A.A. et al. Inorganic arsenic levels in baby rice are of concern. **Environmental Pollution**, v. 152, p. 746—749, 2008. doi:10.1016/j.envpol.2008.01.043
- MEHROTRA, V.; SEHGAL, S. K.; BANGALE, N. R. Fat structure and composition in human milk and infant formulas: implications in infant health. **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 7, p. 1—7, 2018. doi:10.1016/j.plefa.2013.03.002
- MELØ, R.; GELLEIN, K.; EVJE, L.; SYVERSEN, T. Minerais e oligoelementos em alimentos infantis comerciais. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 3339—3342, 2008. doi:10.1016/j.fct.2008.08.007
- MICHAELSEN, K. F.; GREER, F. Protein needs early in life and long-term health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, p. 718S—722S, 2014. doi:10.3945/ajcn.113.072603
- MICHAELSEN, K. F.; SKAFTE, L.; BADSBERG, J. H.; JØRGENSEN, M. Variation in Macronutrients in Human Bank Milk. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. v. 11, n. 2, 229—239, 1990. doi:10.1097/00005176-199008000-00013
- MILLANI, E.; KONSTANTYNER, T.; TADDEI, J. A. A. C. Efeitos da utilização de prebióticos (oligossacarídeos) na saúde da criança. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, n. 4, p. 436—446, 2009.
- MILLWARD, D. J.; LAYMAN, D. K.; TOMÉ, D.; SCHAAFSMA, G. Protein quality assessment: Impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 5, p. 1576—81, 2008.
- MONTEIRO, P. O.; VICTORA, C. G. Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life: a systematic review. **Obesity Reviews**, v. 6, p. 143—154, 2005.
- MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 15, p. 19—29, 2004.
- MORENO-ROJAS, R.; CAÑAL-RUIZ, C.; AMARO-LÓPEZ, M. A.; CÁMARA-MARTOS, F. Probabilistic assessment of the intake of mineral and trace elements by consumption of infant formulas and processed cereal-based food in Spain. **CyTA - Journal of Food**, v. 13, n. 2, p. 243—252, 2015. doi: 10.1080/19476337.2014.946094
- MORISSET, T.; RAMIREZ-MARTINEZ, A.; WESOLEK, N.; ROUDOT, A.-C. Probabilistic mercury multimedia exposure assessment in small children and risk assessment. **Environment International**, 59, 431—44, 2013. doi:10.1016/j.envint.2013.07.003.
- MURPHY, J. J.; O'MARA, F. Nutritional manipulation of milk protein concentration and its impact on the dairy industry. **Livestock Production Science**, v. 35, p. 117—134, 1993.

- NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; BEHARE, P. V.; JAIN, S.; YADAV, H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiology Letters**, v. 334, n. 1, p. 1—15, 2012. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02593.x
- NIETO-RUIZ, A.; GARCÍA-SANTOS, J. A.; BERMÚDEZ M. G. et al., Cortical visual evoked potentials and growth in infants fed with bioactive compounds-enriched infant formula: results from COGNIS randomized clinical trial. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2456, 2019.
- NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; VIEIRA, G. O.; BORBA, L. M. Colostró humano: fonte natural de probióticos? **Journal of Pediatric**, v. 77, n. 4, p. 265—270, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572001000400007>
- NUCCI, A. M.; VIRTANEN, S. M.; BECKER, D. J. Infant feeding and timing of complementary foods in the development of type 1 diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 15, 2015. doi:10.1007/s11892-015-0628-z
- NUNES, L. et al. **Caracterização de fórmulas infantis comerciais**. 31º Congresso Nacional de Laticínios. EPAMIG/ Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Minas Gerais: Juiz de Fora, 2017.
- NUNES, L.; MARTINS, E.; PERRONE, Í. T.; CARVALHO, A. F. D. The maillard reaction in powdered infant formula. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 7, n. 1, p. 33—40, 2019.
- OHRVIK, V. E.; WITTHOFT, C. M. Human folate bioavailability. **Nutrients**, v. 3, p. 475—490, 2011. doi:10.3390/nu3040475
- OLDAEUS, G.; BRADLEY, C. K.; BJORKSTEN, B.; KJELLMAN, N. I. Allergenicity screening of “hypoallergenic” milk-based formulas. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 90, p. 133—135, 1992.
- ONWULATA, C. I.; KONSTANCE, R. P.; TOMASULA, P. M. Minimizing variations in functionality of whey protein concentrates from different sources. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 749—756, 2004.
- OOMEN, A. G. et al. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, p. 0281—0287, 2003.
- OROPEZA-CEJA, L. G.; ROSADO, J. L.; RONQUILLO, D.; GARCÍA, O. P.; CAAMAÑO, M.; GARCÍA-UGALDE, C.; VIVEROS-CONTRERAS, R.; DUARTE-VÁZQUEZ, M. Á. Lower Protein Intake Supports Normal Growth of Full-Term Infants Fed Formula: A Randomized Controlled Trial. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 886, 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10070886>
- ORTEGA-ANAYA, J.; JIMÉNEZ-FLORES, R. Symposium review: the relevance of bovine milk phospholipids in human nutrition – evidence of the effect on infant gut and brain development. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 3, p. 2738—2748, 2019.

- OSREDKAR, J.; SUSTAR, N. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. **Journal of Clinical Toxicology**, S3, 001, 2011
- OSTERTAG, F.; SCHMIDT, C. M.; BERENSMEIER, S.; HINRICHS, J. Development and validation of an RP-HPLC DAD method for the simultaneous quantification of minor and major whey proteins. **Food Chemistry**, v. 342, p. 128176, 2020. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128176
- PACHECO, A. R.; BARILE, D.; UNDERWOOD, M. A.; MILLS, D. A. The impact of the milk glycomiome on the neonate gut microbiota. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 3, p. 419—445, 2015. doi:10.1146/annurev-animal-022114-111112
- PACIFICI, M. G. Effects of vitamin a in neonates and young infants. **International Journal of Pediatrics**, v. 4, n. 2, p. 1339—1354, 2016.
- PADOVANI, R. M.; AMAYA-FARFÁN, J.; COLUGNATI, F. A. B.; DOMENE, S. M. Á. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 741—760, 2006. doi:10.1590/s1415-52732006000600010
- PANDELOVA, M.; LOPEZ, W. L.; MICHALKE, B.; SCHRAMM, K.-W. Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, and Zn contents in baby foods from the EU market: Comparison of assessed infant intakes with the present safety limits for minerals and trace elements. **Journal of Food**, v. 27, p. 120—127, 2012.
- PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOSC, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 88—113, 2007.
- PARK, Y. W.; NAM, M. S. Bioactive peptides in milk and dairy products: a review. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, p. 831—840, 2015. doi:10.5851/kosfa.2015.35.6.831
- PASIAS, I. N.; THOMAIDIS, N. S.; PIPERAKI, E. A. Determination of total arsenic and inorganic species in rice and rice flour by electrom thermal atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 108, p. 1—6, 2013.
- PEREIRA, A. S.; SHITSUKA, D. M.; PARREIRA, F. J.; SHITSUKA, R. **Metodologia da Pesquisa Científica**. Universidade Federal de Santa Maria, 2018.
- PEREIRA, B. F. M.; ALMEIDA, C. C.; LEANDRO, K. C.; DA COSTA, M. P.; CONTE-JUNIOR, C. A.; SPISSO, B. F. Occurrence, sources, and pathways of chemical contaminants in infant formulas. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, p. 1378—1396, 2020. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12559>
- PERELLÓ, G.; LLOBET, J. M.; GÓMEZ-CATALÁN, J.; CASTELL, V.; CENTRICH, F.; NADAL, M.; DOMINGO, J. L. Human health risks derived from dietary exposure to toxic metals in catalonia, spain: temporal trend. **Biological Trace Element Research**, v. 162, n. 1-3, p. 26—37, 2014. doi:10.1007/s12011-014-0138-x

- PESO, E. P.; GONZÁLEZ, B. C. A.; VASALLO, M. M. I.; SANTAELLA, P. M.; ROS, B. G.; FRONTELA, S. C.; MARTÍNEZ, G. C. Alpha-Lactalbumin as an ingredient of infant formula. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 62, n. 1, p. 6—14, 2012.
- PETERSON, R.; CHEAH, W. Y.; GRINYER, J.; PACKER, N. Glycoconjugates in human milk: Protecting infants from disease. **Glycobiology**, v. 23, n. 12, 1425—1438, 2013.
- PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. Handbook of Food Proteins. **A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition**, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9781845697587/handbook-of-food-proteins>
- PIRES, C.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; ROSA, J.C.; COSTA, N.M.B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 179—187, 2006.
- PLAZA-ZAMORA, J.; SABATER-MOLINA, M.; RODRÍGUEZ-PALMERO, M.; RIVERO, M.; BOSCH, V.; NADAL, J. M.; ZAMORA, S.; LARQUÉ, E. Polyamines in human breast milk for preterm and term infants. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 3, p. 524—528, 2013. doi:10.1017/s0007114512005284
- POITEVIN, E. Official methods for the determination of minerals and trace elements in infant formula and milk products: a review. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 1, p. 42—52, 2016. doi:10.5740/jaoacint.15-0246
- POMPEI, C.; ROSSI, M.; MAIRE, F. Protein quality in commercial milk based infant formulas. **Journal of Food Quality**, v. 10, p. 375—381, 1987.
- PRENTICE, P.; ONG, K. K.; SCHOEMAKER, M. H.; TOL, E. A.; VERVOORT, J.; HUGHES, I. A.; ACERINI, C. L.; DUNGER, D. B. Breast milk nutrient content and infancy growth. **Acta Paediatrica**, v. 105, p. 641—647, 2016. doi:10.1111/apa.13362
- PROGRAMA PEDIÁTRICO. **Fórmula infantil: mais próxima do padrão de referência**. Nestlé Nutrition Workshop Series. Sardenha, v. 47, p. 13—26, 2000.
- QAWASMI, A.; LANDEROS-WEISENBERGER, A.; BLOCH, M. H. Meta-analysis of LC-PUFA supplementation of infant formula and visual acuity. **Pediatrics**, v. 131, n. 1, p. e262—e272, 2013. doi:10.1542/peds.2012-0517
- QAWASMI, A.; LANDEROS-WEISENBERGER, A.; LECKMAN, J. F.; BLOCH, M. H. Meta-analysis of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula and infant cognition. **Pediatrics**, v. 129, n. 6, p. 1141—1149, 2012. doi:10.1542/peds.2011-2127
- QIAN, F.; SUN, J.; CAO, D.; TUO, Y.; JIANG, S.; MU, G. Experimental and modelling study of the denaturation of milk protein by heat treatment. **Han-gug Chugsan Sigmum Haghoeji**, v. 37, n. 1, p. 44—51, 2017. <http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.1.44>
- QUEIROZ, V. A. O.; ASSIS, A. M. O.; R. JUNIOR, H. C. Efeito protetor da lactoferrina humana no trato gastrintestinal. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 31, n. 1, 90—95, 2013.

RAI, D.; ADELMAN, A. S.; ZHUANG, W.; RAI, G. P.; BOETTCHER, J.; LONNERDAL, B. Longitudinal changes in lactoferrin concentrations in human milk: a global systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 12, p. 1539—1547, 2014. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.642422>.

RAIKOS, V. Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. a review. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 259—265, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.014>

RAIKOS, V.; DASSIOS, T. Propriedades promotoras de saúde de peptídeos bioativos derivados de proteínas do leite em alimentos infantis: uma revisão. **Dairy Science & Technology**, v. 94, n. 2, p. 91—101, 2013. doi: 10.1007 / s13594-013-0152-3

RÊGO, C.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; FERREIRA, R. Consenso sobre fórmulas infantis: a opinião dos especialistas 1969 portugueses sobre sua composição e suas indicações. **Acta Pediátrica Portuguesa**, v. 31, p. 754—765, 2018. doi:10.20344/amp.10620

REZENDE, R. C. **Lactose**, [s.d.]. Disponível em:<<https://www.infoescola.com/bioquimica/lactose/>>.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. S1—S63, 2010. doi:10.1017/s0007114510003363

ROCHA, H. F. Fórmulas infantis: uma bem vinda revisão de um tema necessário. **Revista de Pediatria**, v. 9, n. 2, p. 55—6, 2008.

ROCHA, K. F. **Análise da rotulagem de fórmulas infantis para lactentes**. 2016. 32 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Nutrição) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016.

ROCHA, L. S.; SOUZA, S.L.Q.; CRUZ, A.G. Contaminantes inorgânicos em produtos lácteos: aspectos regulatórios, fontes de contaminação ao longo do processamento e perigos toxicológicos ao consumidor. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 2, n. 4, 2021.

RÖLLIN, H.; NOGUEIRA, C.; OLUTOLA, B.; CHANNA, K.; ODLAND, J. Prenatal exposure to aluminum and status of selected essential trace elements in rural south African women at delivery. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 7, p. 1494, 2018. doi:10.3390/ijerph15071494

ROLLINS, N. C.; BHANDARI, N.; HAJEEDHOY, N.; HORTON, S.; LUTTER, C. K.; MARTINES, J. C. et al. Why invest, and what it will take to improve breastfeeding practices? **The Lancet**, v. 387, p. 10017, p. 491—504, 2016. doi:10.1016/s0140-6736(15)01044-2

ROMERO, B.; TALESNIK, E.; HARRIS, P.R. Características clínicas asociadas a colitis eosinofílica en lactantes con rectorragia persistente. **Revista Chilena de Pediatría**, v. 85, n. 6, p. 666—673, 2014.

RUIZ-CANO, L. D.; PÉREZ-LLAMAS, F.; ZAMORA, S. Implicaciones de las poliaminas en la salud Infantil. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 110, n. 3, p. 244—250, 2012.

RUTHERFURD, S. M.; MOUGHAN, P. J. Available versus digestible dietary amino acids. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p. S298—S305, 2012.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1—16, 2006.

SABATER, C.; PRODANOV, M.; OLANO, A.; CORZO, N.; MONTILLA, A. Quantification of prebiotics in commercial infant formulas. **Food Chemistry**, v. 194, p. 6—11, 2016. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.127

SAIYED, S. M.; YOKEL, R. A. Aluminium content of some foods and food products in the USA, with aluminium food additives. **Food Additives Contaminants**, v. 22, p. 234—244, 2005. doi: 10.1080/02652030500073584.

SANDSTRÖM, O.; LÖNNERDAL, B.; GRAVERHOLT, G.; HERNELL, O. Effects of alpha-lactalbumin enriched formula containing different concentrations of glycomacropeptide on infant nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 921—928, 2008.

SARACOGLU, S.; SAYGI, K. O.; ULUOZLU, O. D.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Determination of trace element contents of baby foods from Turkey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 280—285, 2007.

SARWAR, G.; BOTTING, H. G.; PEACE, R. W. Amino acid rating method for evaluating protein adequacy of infant formulas. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v. 72, p. 622—626, 1989.

SBP. **Sociedade Brasileira de Pediatria**. Departamento Científico de Nutrologia. Deficiência de vitamina D em crianças e adolescentes. Documento Científico da Sociedade Brasileira de Pediatria. 2014. Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/2015/02/vitamina_d_dcnutrologia2014-2.pdf

SBP. **Sociedade Brasileira de Pediatria**. Departamento de Nutrologia. In: Manual de Alimentação: orientações para alimentação do lactente ao adolescente, na escola, na gestante, na prevenção de doenças e segurança alimentar, 4th ed. pp. 32, 2018. São Paulo: SBP.

SBP. **Sociedade Brasileira de Pediatria**. Posição da Sociedade Brasileira de Pediatria diante do Guia de Alimentação do Ministério da Saúde. Consenso do Departamento de Gastroenterologia da SBP, 2019. Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/ALIMENTACAO_COMPLEMENTAR_MS.pdf

SBP. **Sociedade Brasileira de Pediatria**. Toxicidade do Chumbo na Infância. Nº 3, 08 de março de 2021. Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/22887f-DC-Toxicidade do Chumbo na Infancia.pdf

SCHAAFSMA, G. Advantages and limitations of the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) as a method for evaluating protein quality in human diets. **British Journal of Nutrition**, v. 108, Suppl. 2, p. 333—336, 2012.

SCHULZKE, S. M.; PATOLE, S. K.; SIMMER, K. Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v. 16, n. 2, 2011. doi:10.1002/14651858.CD000375.pub4

SELA, D. A.; CHAPMAN, J.; ADEUYA, A.; KIM, J. H.; CHEN, F.; WHITEHEAD, T. R., et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105, n. 8, 18964—18969, 2008.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades – degradações – modificações**. São Paulo: Varela, 1996. 33—342p.

SHARMA, N.; SHARMA, R.; RAJPUT, Y. S.; MANN, B.; SINGH, R.; GANDHI, K.; Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: critical analysis and options for better resolution. **International Dairy Journal**. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104920>.

SILVA, A. L. C.; RIBEIRO, C. D. S.; MELO, L. R. M.; et al. Vitamina E no leite humano e sua relação com o requerimento nutricional do recém-nascido a termo. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 35, n. 2, p. 158—164, 2017.

SILVA, D. R. B.; MIRANDA-JÚNIOR, P. F.; SOARES, E. A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, n. 2, 123—133, 2007.

SILVA, M. H.; SILVA, M. T. C.; BRANDÃO, S. C.; GOMES, J. C.; PETERNELLI, L. A.; FRANCESCHINI, S. Fatty acid composition of mature breast milk in Brazilian women. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 297—303, 2005.

SILVA, S. A.; DIAS, M. R. M.; FERREIRA, T. A. P. C. Rotulagem de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 185—194, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732008000200007>.

SIPAHI, H.; EKEN, A.; AYDIN, A.; ŞAHİN, G.; BAYDAR, T. Safety assessment of essential and toxic metals in infant formulas. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 56, n. 4, p. 385—391, 2014.

SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, p. 1417—1435, 2013. doi:10.3390/nu5041417

SMILOWITZ, J. T.; LEBRILLA, C. B.; MILLS, D. A.; GERMAN, J. B.; FREEMAN, S. L. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. **Annual Review of Nutrition**. v. 34, 143—169, 2014.

SOCHA, P.; GROTE, V.; GRUSZFELD, D.; JANAS, R.; DEMMELMAIR, H. et al. Milk protein intake, the metabolic-endocrine response, and growth in infancy: data from a

randomized clinical trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p. 1776S—1784S, 2011.

SOLÉ, D. et al. Consenso brasileiro sobre alergia alimentar: 2018 - Parte 2: Diagnóstico, tratamento e prevenção. Documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 2, n. 1, p. 39—82, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/2526-5393.20180005>

SOUZA, A. B.; COSTA-JUNIOR, L. C. G.; STEPHANI, R.; OLIVEIRA, M. A. L.; PERRONE, Í. T.; COSTA, R. G. B. Evaluation of the viscosity profile obtained for dispersions containing different proportions of milk protein concentrate/whey protein concentrate during simulated conditions of thermal processing. **Lebensmittel- Wissenschaft + Technologie**, v. 64, n. 2, p. 536—539, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.058>

SOUSA, R.; PORTMANN, R.; DUBOIS, S.; RECIO, I.; EGGER, L. Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model. **Food Research International**, v. 130, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108996>

SOUZA, L. M. B. de M.; ALMEIDA, J. G. História da alimentação do lactente no Brasil: do leite mais fraco a biologia da excepcionalidade. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.

STRÖMQVIST, M.; FALK, P.; BERGSTRÖM, S.; HANSSON, L.; LÖNNERDAL, B.; NORMARK, S.; et al. Human milk kappa-casein and inhibition of helicobacter pylori adhesion to human gastric mucosa. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 21, p. 288—296, 1995.

SUZUKI, Y. A.; LOPEZ, V.; LÖNNERDAL, B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 2560—2575, 2005.

TAN, H.; O'TOOLE, P. W. Impact of diet on the human intestinal microbiota. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 71—77, 2015. doi:10.1016/j.cofs.2015.01.005

TANAKA, M.; NAKAYAMA, J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. **Allergology International**, v. 66, p. 515—522, 2017. doi:10.1016/j.alit.2017.07.010

TARI, N. R.; FAN, M. Z.; ARCHBOLD, T.; KRISTO, E.; GURI, A.; ARRANZ, E.; CORREDIG, M. Effect of milk protein composition of a model infant formula on the physicochemical properties of in vivo gastric digestates. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2851—2861, 2018. doi:10.3168/jds.2017-13245

TEUCHER, B.; MAJSK-NEWMAN, G.; DAINY, J. R.; MCDONAGH, D.; FITZGERALD, R. J.; FAIRWEATHERAIT, S. J. Calcium absorption is not increased by caseinophosphopeptides. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 162—166, 2006.

- THURL, S.; MUNZERT, M.; HENKER, J.; BOEHM, G.; MÜLLER-WERNER, B.; JELINEK, J.; STAHL, B. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 9, p.1261—271, 2010. doi:10.1017/S0007114510002072
- TIMBY, N.; DOMELLÖF, M.; LÖNNERDAL, B.; HERNELL, O. Supplementation of infant formula with bovine milk fat globule membranes. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, n. 2, p. 351—355, 2017.
- TRABULSI, J.; CAPEPING, R.; LEBUMFACIL, J. et al. Effect of an α -lactalbumin-enriched infant formula with lower protein on growth. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 167—174, 2011. doi:<https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.236>
- TRUMBO, P.; YATES, A. A.; SCHLICKER, S.; POOS, M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, n. 3, p. 294—301, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0002-223\(01\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0002-223(01)00078-5)
- TURGEON, S. L.; RIOUX, L.-E. Food matrix impact on macronutrients nutritional properties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1915—1924, 2011. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.02.026
- UNICEF. **United Nations International Children's Emergency Fund**. Levels and trends in child malnutrition. UNICEF / WHO / World Bank Group Joint Child Malnutrition Estimates Key findings of the 2020; 2020. Disponível em: [file:///C:/Users/casa/Downloads/9789240003576-eng%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/casa/Downloads/9789240003576-eng%20(1).pdf)
- UNICEF. **United Nations International Children's Emergency Fund**. UNICEF's approach to scaling up nutrition for mothers and their children. Discussion paper. Programme Division, UNICEF, New York, NY: United Nations Children's Fund; 2015. Disponível em: <http://www.acp.int/sites/acpsec.waw.be/files/UNICEF.pdf>
- URASHIMA, T.; FUKUDA, K.; MESSER, M. Evolution of milk oligosaccharides and lactose: a hypothesis. **Animal**, v. 6, n. 3, p. 369—374, 2012. doi:10.1017/s1751731111001248
- USDA. **United States Department of Agriculture**. Dietary guidelines for americans. 7. ed. Washington, DC: Government Printing Office, 2010.
- VALENTINE, C. J.; WAGNER, C. L. Nutritional management of the breastfeeding dyad. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, 261—274, 2013. doi:10.1016/j.pcl.2012.10.008
- VAN DEN BROEK, L. A. M.; HINZ, S. W. A.; BELDMAN, G.; VINCKEN, J. P.; VORAGEN, A. G. J. Bifidobacterium carbohydrases – their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 146—163, 2008. doi:10.1002/mnfr.200700121
- VANDENPLAS, Y. Prevention and management of cow's milk allergy in non- exclusively breastfed infants. **Nutrients**, v. 9, p. 1—15, 2017. doi:10.3390/nu9070731

- VASCONCELOS, M. J. O. B. et al. **Nutrição clínica: Obstetrícia e pediatria**. Rio de Janeiro: MedBook, 2011.
- VAZ, A. M.; OLIVEIRA, G. G.; PINHEIRO, M. S.; MEDEIROS, E. F. F. Suplementação na infância e a prevenção da carência de micronutrientes: artigo de revisão. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 6, n. 1, p. 116—131, 2017.
- VIANNA, C. C. R. **Caracterização de fórmulas infantis para lactentes usando espectroscopia no infravermelho médio**. 2018. 95 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2018.
- VICTORA, C. G.; BAHL, R.; BARROS, A. J. D.; FRANÇA, G. V. A.; HORTON, S.; KRASEVEC, J.; MURCH, S.; SANKAR, M. J.; WALKER, N.; ROLLINS, N. C. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **The Lancet**. v. 387, 475—90, 2016. doi: 10.1016/s0140-6736(15)01024-7
- VINAGRE, R. D.; DINIZ, E. M. A.; VAZ, F. A. C. Leite Humano: um pouco de sua história. **Pediatria**, v. 23, n. 4, p. 340—345, 2001.
- VINCENZETTI, S.; PUCCIARELLI, S.; POLZONETTI, V.; POLIDORI, P. Role of proteins and of some bioactive peptides on the nutritional quality of donkey milk and their impact on human health. **Beverages**, v. 3, n. 4, p. 34, 2017. doi:10.3390/beverages3030034
- VOGEL, H. J. Lactoferrin, a bird's eye view. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 90, p. 233—244, 2012.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2. ed.). New York, EUA: Taylor & Francis Group, 2006; 166—167p.
- WEFFORT, V. R. S. Alimentação láctea no primeiro ano de vida. **Textos Científicos da Sociedade Mineira de Pediatria**, 2006. Disponível em: <http://www.smp.org.br>
- WEISER, M. J.; BUTT, C. M.; MOHAJERI, M. H. Docosahexaenoic acid and cognition throughout the lifespan. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 99, 2016. doi:10.3390/nu8020099
- WELZ, B.; SPERLING M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3. ed., New York: Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- WENG, S. F.; REDSELL, S. A.; SWIFT, J. A.; YANG, M.; GLAZEBROOK, C. P. Systematic review and meta-analyses of risk factors for childhood overweight identifiable during infancy. **Archives of Disease in Childhood**, v. 97, p. 1019—1026, 2012.
- WHITFORD, D. **Proteins: structure and function**. London, UK: Wiley, 2005
<https://www.wiley.com/en-gb/Proteins%3A+Structure+and+Function-p-9780471498940>
- WHO. **World Health Organization**. International code of marketing of breast milk substitutes. Geneva: WHO, 1981. Disponível em:
https://www.who.int/nutrition/publications/code_english.pdf

WHO. **World Health Organization**. Children's exposure to mercury compounds. Geneva, Switzerland. 2010. Disponível em:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44445/9789241500456_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y&ua=1

WHO. **World Health Organization**. Global Strategy for Infant and Young Children. Geneva, Switzerland: WHO, 2003a.
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42590/9241562218.pdf?sequence=1>

WHO. **World Health Organization**. Hydrogen sulfide in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization, 2003b (WHO/SDE/WSH/03.04/7). Disponível em:
<file:///C:/Users/casa/Downloads/9789241549950-eng.pdf>

WHO. **World Health Organization**. Infant and young child feeding: Model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals. Geneva: WHO; 2009.

WHO. **World Health Organization**. Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition. In: World Health Organization technical report series, v. 935, p. 1— 65, 2007.

WHO. **World Health Organization**. Marketing of breastmilk substitutes: National implementation of the International Code. Status Report, 2018. Disponível em:
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272649/9789241565592-eng.pdf?ua=1>

WHO. **World Health Organization**. WHO Child Growth Standards: Length/Height-for-Age, Weight-for-Age, Weight-for-Length, Weight-for-Height and Body Mass Index-for-Age: Methods and Development. Geneva: WHO, 2006. Disponível em:
[file:///C:/Users/casa/Downloads/924154693X_eng%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/casa/Downloads/924154693X_eng%20(1).pdf)

WHO. **World Health Organization**. Preventing disease through healthy environments - Exposure to cadmium: A major public health concern. Geneva, Switzerland: Author, 2019a. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329480/WHO-CED-PHE-EPE-19.4.3-eng.pdf?ua=1>

WHO. **World Health Organization**. Preventing disease through healthy environments - Exposure to lead: A major public health concern. Geneva, Switzerland: Author, 2019b. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329953/WHO-CED-PHE-EPE-19.4.7-eng.pdf?ua=1>

WHO. **World Health Organization**. Preventing disease through healthy environments— Exposure to arsenic: A major public health concern. Geneva, Switzerland: Author, 2019c. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329482/WHO-CED-PHE-EPE-19.4.1-eng.pdf?ua=1>

WHO. **World Health Organization**. The global burden of disease: 2004 update. Geneva: WHO, 2008. Disponível em:
https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf?ua=1

WHO. **World Health Organization**. The Quantity and quality of breast milk: report on the WHO Collaborative Study on Breast-feeding. World Health Organization, 1985. Disponível em:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39047/9241542012_%28part1%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y

WHO. **World Health Organization/ Food and Drug Administration**. Dose-response assessment and derivation of health-based guidance values. In: WHO. Environment health criteria 240 – Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. 2009. Disponível em:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44065/WHO_EHC_240_8_eng_Chapter5.pdf?sequence=8

YE, A.; CUI, J.; CARPENTER, E.; PROSSER, C.; SINGH, H. Dynamic in vitro gastric digestion of infant formulae made with goat milk and cow milk: influence of protein composition. **International Dairy Journal**, v. 97, p. 76—85, 2019.
doi:10.1016/j.idairyj.2019.06.002

ZHANG, Z.; ADELMAN, A. S.; RAI, D. et al. Amino acid profiles in term and preterm human milk through lactation: a systematic review. **Nutrients**, v. 5, p. 4800—4821, 2013.
doi:10.3390/nu5124800

ZOR, T.; SELLINGER, Z. Linearization of the bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. **Analytical Biochemistry**, v. 236, p. 302—308, 1996.

APÊNDICE A – CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS (mg.g ptn⁻¹) DAS FÓRMULAS INFANTIS DE FASE 1 E DE FASE 2

Aminoácidos Essenciais	Referência	Fórmula infantil fase 1 (mg/g ptn)					Fórmula infantil fase 2 (mg/g ptn)				
	FAO/WHO (mg.g ptn ⁻¹)*	ME1	NC1	NN1	DM1	DA1	ME2	NC2	NN2	DM2	DA2
Treonina	31	30,3	28,02	23,0	26,23	36,22	19,4	15,47	19,01	28,0	21,0
Lisina	57	1,4	2,0	2,0	1,0	1,19	1,0	1,0	1,0	1,15	1,0
Histidina	20	1,2	1,29	1,0	1,0	1,17	1,0	1,0	0,40	1,0	1,0
Valina	43	3,0	12,0	9,13	8,42	2,25	2,0	6,14	8,0	7,40	1,21
Metionina + Cisteína	28	7,3	12,21	10,01	12,49	10,0	5,0	7,0	9,0	13,0	5,0
Isoleucina	32	7,3	8,13	7,0	11,0	11,02	5,0	4,25	5,07	12,0	5,0
Leucina	66	5,8	24,26	19,25	25,0	35,0	16,0	13,0	16,03	27,0	18,0
Fenilalanina	52	20,1	22,0	18,71	20,07	22,0	14,0	12,04	16,48	19,35	14,0
Triptofano	8,5	1,1	1,21	1,0	1,0	1,0	1,0	0,51	1,0	1,0	1,0

Nota: *Valores de referência (mg.g ptn⁻¹) para a ingestão diária de aminoácidos para crianças de 0 a 12 meses (Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007).

APÊNDICE B – VALORES OBTIDOS PELO CÁLCULO DA INGESTÃO DIÁRIA ESTIMADA PARA OS MINERAIS ESSENCIAIS DAS FÓRMULAS INFANTIS DE FASE 1 E FASE 2 E OS VALORES RECOMENDADOS (EAR) PARA CONSUMO

Fórmulas infantis	Minerais (mg/100kcal)													
	Cálcio	Magnésio	Sódio	Potássio	Fósforo	Ferro	Zinco	Cobre	Cromo	Molibdênio	Selênio	Iodo	Cobalto	Manganês
AI (0 a 6 meses)	210	30	n.d.	0,27	100	0,27	2	0,2	200	0,002	0,015	0,11	0,2	0,003
ME1A	338,3	55,7	152,1	522,5	355,4	6,4	5,2	0,6	30014,7	31,9	0,03	0,05	0,9	0,3
ME1B	481,5	56,9	169,0	454,2	372,8	5,9	3,8	0,2	38577,5	48,9	0,02	0,04	1,2	1,0
ME1C	437,7	51,4	183,2	422,2	314,5	6,1	2,9	0,2	31059,9	44,6	0,02	0,03	1,1	0,4
NC1A	282,9	69,0	125,2	381,9	222,7	7,0	5,0	0,5	33624,0	11,7	0,05	0,07	1,1	0,4
NC1B	356,9	75,8	178,3	443,3	245,0	6,7	5,0	0,4	33951,3	10,4	0,05	0,06	0,8	0,4
NC1C	286,7	66,7	133,5	394,8	219,1	6,6	5,0	0,4	25397,2	11,9	< LQ	0,07	0,9	0,4
NN1A	396,2	73,9	209,7	430,7	297,7	6,1	5,1	0,4	32005,3	10,9	0,04	0,08	1,1	0,5
NN1B	480,9	74,1	238,3	504,5	292,2	8,3	5,9	0,5	28811,9	13,4	0,02	0,08	1,1	0,5
NN1C	469,8	71,2	228,6	490,4	311,9	6,3	5,2	0,4	29487,9	13,6	< LQ	0,08	1,3	0,5
DM1A	409,6	42,2	165,7	370,4	270,1	7,2	3,4	0,3	26677,6	27,0	0,04	0,04	0,8	0,4
DM1B	438,8	43,3	149,5	365,7	293,4	6,1	3,1	0,4	28578,9	27,4	0,05	0,04	0,9	0,3
DM1C	438,1	45,4	161,0	377,3	297,1	7,5	3,4	0,3	23919,6	27,5	0,05	0,04	0,9	0,3
DA1A	477,8	35,9	179,9	459,4	270,8	6,9	3,3	0,3	30244,1	13,3	0,04	0,05	1,0	0,4
DA1B	436,5	36,3	159,0	399,1	256,9	7,2	3,5	0,3	26260,0	14,5	0,05	0,05	1,0	0,4
DA1C	514,7	42,0	179,4	425,1	321,2	7,3	4,0	0,4	23158,1	11,7	0,02	0,04	0,9	0,4
AI/EAR*(7 a 12 meses)	270	75	n.d.	11	275	6,9*	3	0,22	5500	0,003	0,02	0,13	0,22	0,6
ME2A	693,1	63,2	262,1	635,8	444,3	8,7	4,9	0,3	36358,5	27,2	0,03	0,05	1,24	0,45
ME2B	791,6	67,2	339,6	795,8	459,3	9,4	3,1	0,2	50320,3	43,7	0,05	0,07	1,70	0,44
ME2C	800,1	66,8	323,7	757,4	478,5	9,5	4,2	0,2	45934,6	42,2	0,05	0,07	1,66	0,41
NC2A	700,2	79,4	281,0	615,9	453,3	9,0	4,4	0,4	41769,8	6,2	0,06	0,06	1,90	0,35
NC2B	718,9	80,9	271,0	637,1	463,7	9,8	4,8	0,4	43025,1	13,5	< LQ	0,07	1,87	0,39
NC2C	733,1	82,2	283,8	704,8	472,0	8,8	4,6	0,4	41745,4	6,1	0,06	0,06	1,86	0,36
NN2A	556,1	58,5	263,0	494,7	380,3	7,1	3,8	0,3	30733,8	12,3	< LQ	0,06	1,52	0,32
NN2B	583,0	57,7	273,1	500,7	377,7	6,7	3,8	0,3	29703,3	12,1	0,02	0,07	1,35	0,36
NN2C	513,4	59,6	268,9	487,7	369,9	6,2	3,5	0,3	30954,6	15,1	0,03	0,07	1,38	0,30
DM2A	612,0	55,5	195,0	467,8	448,3	10,6	7,2	0,3	59580,4	34,7	0,12	0,05	1,63	0,37
DM2B	667,7	55,1	264,6	587,4	438,1	10,9	4,5	0,3	53553,7	35,6	0,18	0,06	1,45	0,36
DM2C	646,6	55,0	245,4	586,6	445,2	10,4	4,7	0,3	48762,6	39,4	0,08	0,07	1,64	0,37
DA2A	711,9	42,7	285,2	645,0	341,0	11,4	5,0	0,4	39400,6	37,7	0,05	0,04	1,24	0,40
DA2B	617,0	41,3	238,7	548,1	341,7	11,2	5,2	0,3	41971,6	24,3	0,06	0,04	1,35	0,39
DA2C	675,6	46,0	207,8	521,7	348,8	8,7	5,4	0,4	40239,5	40,9	0,06	0,04	1,41	0,38

Nota: AI (*adequate intake*); EAR: (*Estimated average requirement*).

APÊNDICE C – VALORES DE MACRONUTRIENTES EM 100 kcal EXPRESSOS NOS RÓTULOS DAS FÓRMULAS INFANTIS DE FASE 1 E FASE 2

Macronutrientes - Informação Nutricional									
Fls	Kcal	Glutén	Proteína (g/100kcal)	Gorduras Totais (g/100kcal)	Ácidos Graxos trans⁽¹⁾	Ácido Linoléico (mg/100kcal)⁽²⁾	α-Ácido Linoléico (mg/100kcal)⁽²⁾	Carboidratos Totais (g/100kcal)	Lactose (g/100 kcal)
ME1	486	0	2,0	5,3	0,0	900,0	103,0	11,0	11,0
ME2	490	0	2,4	5,1	0,0	788,0	75,0	11,0	11,0
NC1	505	0	1,8	5,5	0,0	811,9	94,1	10,9	10,9
NC2	474	0	1,9	4,6	0,0	696,2	80,2	12,7	12,7
NN1	497	0	2,2	4,4	0,0	623,7	76,5	11,7	8,2
NN2	472	0	2,3	5,5	0,0	805,1	97,5	11,7	9,3
DM1	508	0	2,2	5,3	0,0	n.a.	n.a.	11,2	11,2
DM2	483	0	2,9	4,6	0,0	n.a.	n.a.	11,4	9,7
DA1	484	0	2,0	5,0	0,0	743,8	124,0	11,4	11,4
DA2	457	0	2,4	4,6	0,0	919,0	131,3	12,0	11,6

⁽¹⁾O conteúdo de ácidos graxos trans no produto não ultrapassa 3% do conteúdo total de ácidos graxos tanto nas Fórmulas infantis para lactentes, quanto para as Fórmulas infantis de seguimento para lactentes?

⁽²⁾A razão mínima de ácido linoléico/ácido alfa-linolênico é de 5:1 e a máxima de 15:1, tanto para as Fórmulas infantis para lactentes, assim como para as Fórmulas infantis de seguimento para lactentes?

**APÊNDICE D - VALORES DE INGREDIENTES OPCIONAIS EM 100 kcal EXPRESSOS NOS RÓTULOS DAS FÓRMULAS INFANTIS
DE FASE 1 E FASE 2**

Ingredientes opcionais - Informação Nutricional									
Fls	Kcal	Taurina (mg/100kcal)	Nucleotídeos (mg/100kcal)	DHA⁽¹⁾	ARA⁽²⁾	EPA⁽³⁾	FOS⁽⁴⁾	GOS⁽⁴⁾	Probióticos⁽⁵⁾
ME1	486	6	n.a.	17	34	n.a.	0,6	0,6g	n.a.
ME2	490	6	n.a.	17	34	n.a.	0,6	0,3	n.a.
NC1	505	6,5	3,2	10,5	10,5	n.a.	0,1	0,5	n.a.
NC2	474	n.a.	3,4	10,5	10,5	n.a.	0,1	0,5	n.a.
NN1	497	7,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,1	0,5	n.a.
NN2	472	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,1	0,6	n.a.
DM1	508	6,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
DM2	483	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
DA1	484	7,4	4,8	9,9	9,7	1,6	0,1	1,1	n.a.
DA2	457	8,1	4,8	9,4	10,5	1,8	0,1	1,1	n.a.

⁽¹⁾Corresponde a 0,5% do conteúdo total de gorduras?

⁽²⁾Ácido araquidônico (ARA) atinge a mesma concentração do DHA?

⁽³⁾Ácido eicosapentaenoico excede o conteúdo de DHA?

⁽⁴⁾A quantidade adicionada de Frutooligossacarídeos (FOS) e Galactooligossacarídeos (GOS) ultrapassa o limite de 0,8 g/100 mL em uma combinação de 10% de FOS e 90% de GOS?

⁽⁵⁾O conteúdo de bactérias viáveis (Probióticos) está entre 10^6 a 10^8 UFC/g do produto pronto para consumo?

APÊNDICE E - VALORES DE MICRONUTRIENTES EM 100kcal EXPRESSOS NOS RÓTULOS DAS FÓRMULAS INFANTIS DE FASE 1 E FASE 2

Micronutrientes - Informação Nutricional														
Fls	Kcal	Ácido Fólico (mcg/100kcal)	Ácido Pantotênico (mcg/100kcal)	Biotina (mcg/100kcal)	Niacina (mcg/100kcal)	Riboflavina (mcg/100kcal)	Tiamina (mcg/100kcal)	Vit. A (mcg RE/100kcal)	Vit. B6 (mcg/100kcal)	Vit. B12 (mcg/100kcal)	Vit. C (mcg/100kcal)	Vit. D3 (mcg/100kcal)	Vit. E (mg α-TE/100kcal)	Vit. K (mcg/100kcal)
ME1	486	13	500	3	1000	180	90	108	70	0,32	200	1,5	1,2	14
ME2	490	13	520	3	1000	180	96	90	90	0,36	170	7,3	1,3	8
NC1	505	15	713	3	851	178	119	91	65	0,20	168,3	2,0	1,4	8,9
NC2	474	25	1181	4	907	232	211	116	118	0,25	168,8	2,3	2,3	9,3
NN1	497	26	1288	5	1006	241	201	115	117	0,30	150,9	2,2	2,2	9,1
NN2	472	18	763	3	847	169	133	121	74	0,25	233,1	1,9	1,7	9,5
DM1	508	18	492	2	650	150	75	83	61	0,30	120,1	1,8	1,4	7,5
DM2	483	18	497	2	663	133	75	95	66	0,31	134,6	2,1	1,2	8,9
DA1	484	19	506	2	661	135	78	89	80	0,27	181,8	1,9	1,6	8,1
DA2	457	18	733	2	917	151	86	114	112	0,31	183,8	2,6	2,4	8,3

Micronutrientes - Informação Nutricional																
Fls	Kcal	Cálcio (mg/100kcal)	Cloreto (mg/100kcal)	Cobre (mcg/100kcal)	Ferro (mg/100kcal)	Fósforo (mg/100kcal)	Iodo (mcg/100kcal)	Manganês (mcg/100kcal)	Magnésio (mg/100kcal)	Potássio (mg/100kcal)	Selênio (mcg/100kcal)	Sódio (mg/100kcal)	Zinco (mg/100kcal)	Colina (mg/100kcal)	Mio-Inositol (mg/100kcal)	L-Carnitina (mg/100kcal)
ME1	486	92	79	63	1	53	16	13	12,1	104	1,5	30	0,72	24	5,4	1,5
ME2	490	118	116	75	1,6	64	20	15	12,0	152	2,3	45	0,8	24	5,2	n.a.
NC1	505	63,4	73,3	79,2	1,1	33,7	23,8	21,8	11,7	95,0	2,8	25,7	1,1	10,9	10,9	2,0
NC2	474	120,3	65,4	75,9	1,6	69,6	27,4	9,5	n.d.	126,6	2,0	44,3	1,1	14,8	8,4	n.a.
NN1	497	110,7	64,4	72,4	1,6	62,4	24,1	22,1	11,9	116,7	2,8	33,2	1,2	12,1	10,1	2,4
NN2	472	80,5	78,4	84,7	1,2	44,5	31,8	12,7	12,5	132,4	2,3	50,8	1,2	16,9	7,4	n.a.
DM1	508	79,1	76,4	63,0	1,2	49,6	15,2	9,8	11,6	96,9	2,2	37,4	0,8	14,8	n.a.	1,7
DM2	483	114,7	106,0	64,2	1,8	70,4	1,8	11,4	12,2	133,1	2,9	49,7	1,0	15,5	n.a.	2,1
DA1	484	94,0	77,9	67,8	1,3	57,2	22,1	17,8	12,2	99,4	3,5	35,7	0,9	17,4	5,0	1,4
DA2	457	120,1	102,4	67,4	1,8	70,0	18,6	13,3	12,9	130,4	2,8	40,7	1,1	14,9	5,5	1,8