

## ANÁLISE DO LEITE HUMANO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

**Reche, A. N.; Santos, P. M.; Cardoso, M. A. G.; Uehara, M.; Sakane, K. K.**

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Universidade do vale do Paraíba  
Avenida Shishima Hifumi nº 2911, Urbanova, São José dos Campos, São Paulo  
CEP: 12244-000  
lainereche@hotmail.com

**Resumo** - O leite materno é o alimento mais adequado para suprir as necessidades da criança e seus benefícios englobam os pais e a sociedade. Cada mulher produz leite específico para seu filho fazendo com que esta criança cresça eutrofica. Tanta importância do aleitamento materno, este trabalho se propõe a análise do leite humano por espectroscopia no infravermelho. Quatro amostras de leite humano A, B, C e D foram analisadas. O grau de semelhança dos espectros infravermelhos de quatro amostras de leite materno foi analisado utilizando a análise estatística multivariada. Seus resultados mostraram clara discriminação entre as amostras de leite humano A, B, C e D. As regiões de lipídios, proteínas e lactose foram identificadas nos espectros. Os cálculos das áreas relativas entre lipídios e proteínas e entre lactose e proteínas mostraram variações nas concentrações dos componentes do leite. Os resultados do estudo mostram o potencial do uso de espectroscopia no infravermelho para análise dos componentes do leite humano.

**Palavras-chave:** Espectroscopia, Leite Humano

**Área do Conhecimento:** Ciências da Saúde

### Introdução

Indubitavelmente o leite humano exclusivo é o alimento adequado para as crianças até os seis meses de idade e é recomendado até os dois anos de idade ou mais, concomitante com a introdução gradativa de outros alimentos. Consensualmente a Academia Americana de Pediatria, o Fundo das Nações Unidas para a Infância – Unicef, o Ministério da Saúde e a Sociedade Brasileira de Pediatria afirmam que o leite materno é o alimento adequado para a criança.

As proteínas, açúcares, gorduras, sais minerais e vitaminas estão presentes em quantidade adequada para suprir as necessidades da criança (REGO, 2008). As vantagens do aleitamento materno não se restringem somente ao lactente, mas também aos pais e sociedade. Segundo Giugliani (2005) o aleitamento materno é considerado uma das estratégias de saúde de maior custo benefício, pois diminui gasto das famílias, dos serviços de saúde e sociedade em geral ao eliminar despesas com internamentos, leites artificiais e mamadeiras. Além disso, a lactação é um ato ecológico, não agride a natureza e é totalmente renovável. Para Nóbrega (2009) a nutriz produz leite adaptado às necessidades do lactente e ocorrem alterações nas concentrações dos componentes do leite de acordo com as características da criança. Moura

(2005) expõe que o leite humano apresenta variação própria, tem mais de 200 substâncias e nem todas foram totalmente estudadas.

Dada a importância do aleitamento materno, o presente trabalho objetiva-se a análise do leite humano por espectroscopia no Infravermelho.

A grande vantagem da espectroscopia infravermelha para o estudo de biomoléculas é a obtenção de espectros de boa qualidade com pequenas quantidades (10-100 µg) em meios diferentes e muitas vezes na presença de outras biomoléculas. Com avanço de instrumentações computacionais, a superposição de vários componentes presentes em biomoléculas pode ser analisados utilizando diversos recursos matemáticos (MANTSCH; CHAPMAN, 1996). Assim, sistemas biológicos tais como proteínas, lipídios, biomembranas, carboidratos, fármacos e tecidos têm sido caracterizados com sucesso utilizando a espectroscopia no Infravermelho (STUART, 1997). Na faixa de 10 000 cm<sup>-1</sup> a 100 cm<sup>-1</sup> do espectro eletromagnético, a radiação infravermelha converte-se, quando absorvida, em energia de vibração molecular (SIVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). As frequências de luz infravermelha que são absorvidas são aquelas que têm as mesmas frequências dos modos vibracionais. O espectro vibracional aparece como uma série de picos ou bandas as quais refletem o nível de energia vibracional da molécula (SIVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Certos

grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma região, independentemente da estrutura da molécula. Essas bandas chamadas características permitem aos espectroscopistas a obtenção de informações para fazer a identificação de estruturas (SIVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

A espectroscopia no Infravermelho foi escolhida para analisar a composição do leite materno, pois como a intensidade das bandas nos espectros infravermelhos se relaciona com a população e as biomoléculas possuem regiões específicas de absorção, esta técnica possibilita a realização de análise quantitativa.

### Metodologia

Foram utilizadas quatro amostras de leite humano denominados A, B, C e D. As amostras foram cedidas pelo Banco de Leite Humano do Hospital Universitário do Oeste do Paraná situado na cidade de Cascavel no estado do Paraná.

O leite fornecido encontrava-se “*in natura*” armazenado sob refrigeração. Uma fração de 5 ml foi congelada para transporte e posterior análise.

No laboratório de Espectroscopia no Infravermelho as amostras de leite humano foram liofilizadas por 12 horas. Os espectros

infravermelhos no intervalo de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  foram obtidos com técnicas de pastilhas em KBr a temperatura controlada de 18 a 20  $^{\circ}\text{C}$ . A resolução foi de 4  $\text{cm}^{-1}$  no modo de transmissão com 12 varreduras. O espectrofotômetro utilizado foi Spectrum GX FT-IR da PerkinElmer do IP&D, UNIVAP

Os espectros foram pré-processados com o software Spectrum 5.3 (PerkinElmer), onde foram feitas as correções de linha de base, suavização espectral através do algoritmo Savitzky Golay (9 pontos), em absorbância e normalização.

Foi utilizada a análise estatística multivariada por agrupamento. Nesta técnica, dado um conjunto de objetos, cada qual é caracterizado por variáveis, procurando descobrir um modo de agrupá-los conforme o grau de semelhança (JOHNSON; WICHERN, 1992). Foi feita a análise por componentes principais e análise de agrupamento no software MINITAB 15. Para o agrupamento hierárquico foi utilizado o algoritmo Ward, considerado o mais eficiente método de agrupamento hierárquico (SANTOS, 2011; EVERITT, 1994; WARD, 1963).

Após identificadas as regiões de proteínas, lipídios e lactose nos espectros infravermelhos foram calculadas as áreas relativas.

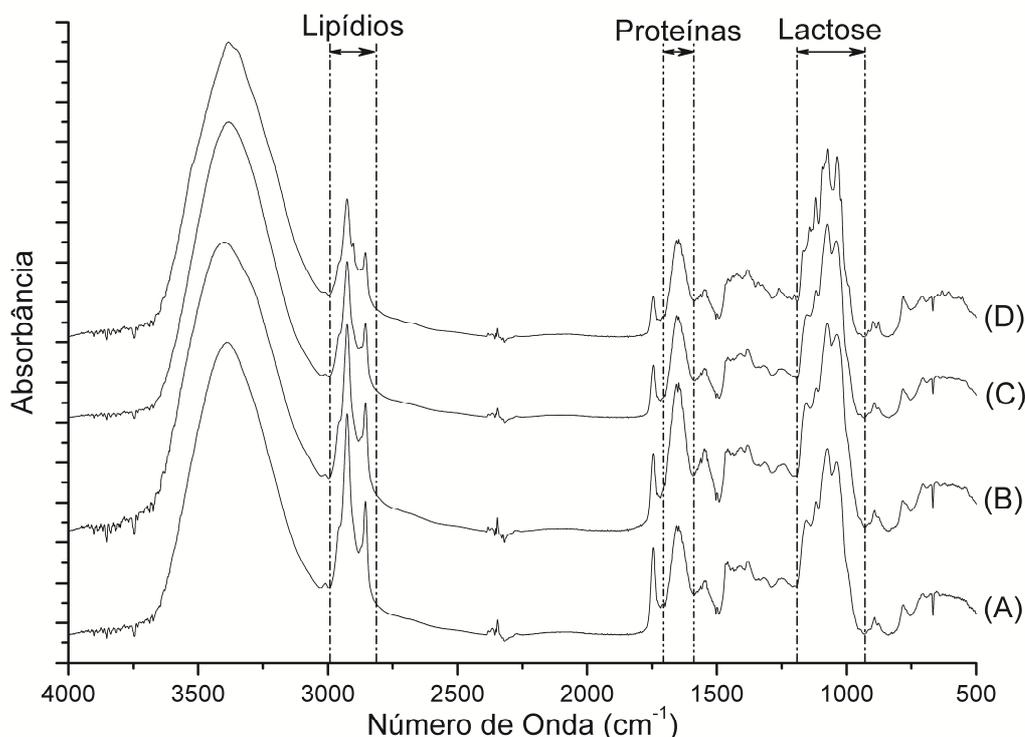


Figura 1- Espectros das amostras de leite materno (A,.B,C e D).

**Resultados**

Os espectros da figura 1 mostram os espectros infravermelhos das amostras de leite materno A, B, C e D. As regiões de lipídios, amida I da proteína e lactose são assinaladas na figura 1.

Por inspeção visual nas regiões indicadas é possível observar pequenas diferenças nos

contornos de bandas e/ou nas intensidades relativas entre os picos. Os resultados da análise estatística multivariada mostram a clara discriminação entre as amostras de leite materno mostrada na forma de dendrograma apresentada na figura 2.

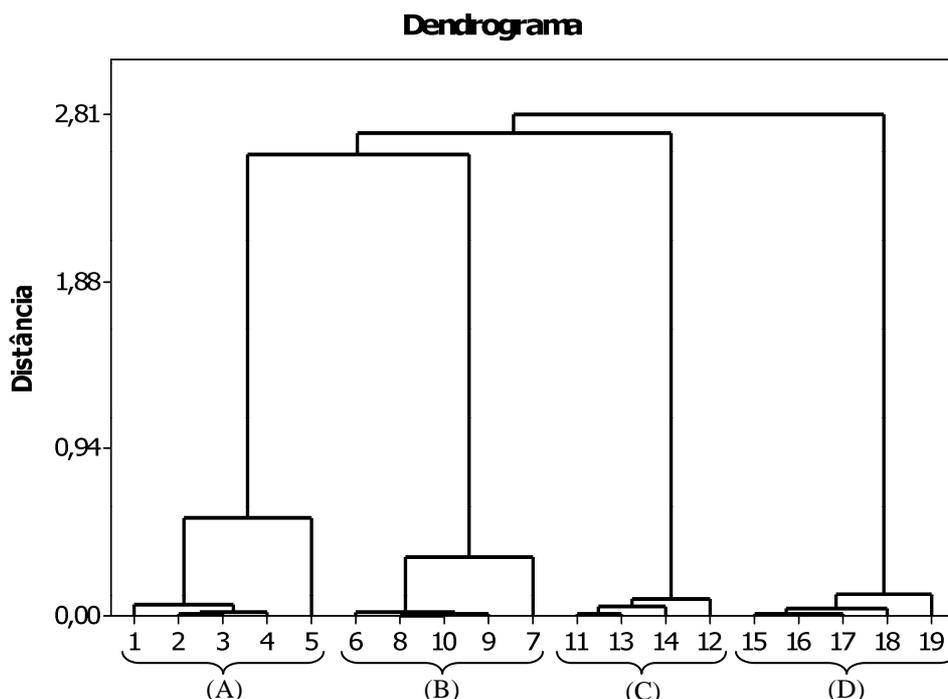


Figura 2- Dendrograma dos espectros das amostras (A), (B), (C) e (D) de leite materno.

Foram calculadas as áreas nos intervalos de: (a) 2995 e 2830  $\text{cm}^{-1}$ ; (b) 1700 e 1590  $\text{cm}^{-1}$  e (c) 1190 e 955  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos lipídios, amida I de proteínas e lactoses (MANTSCH; CHAPMAN, 1996), respectivamente.

A região de 2995 a 2830  $\text{cm}^{-1}$  se refere aos modos normais de vibração dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  de ácidos graxos; a de 1700 a 1590  $\text{cm}^{-1}$ , a amida I da proteína que representa 80 % da vibração do estiramento  $\text{C}=\text{O}$  e a de 1190 a 955  $\text{cm}^{-1}$ , as vibrações das ligações  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  de polissacarídeos.

Tabela 1: Áreas relativas entre lipídio/proteína e lactose/proteína

Leite Materno	Área relativa	
	lipídio/proteína	lactose/proteína
Amostra A	2,079	3,147
Amostra B	1,788	3,351
Amostra C	1,452	2,472
Amostra B	1,546	2,529

Os resultados de áreas relativas são mostrados na tabela 1

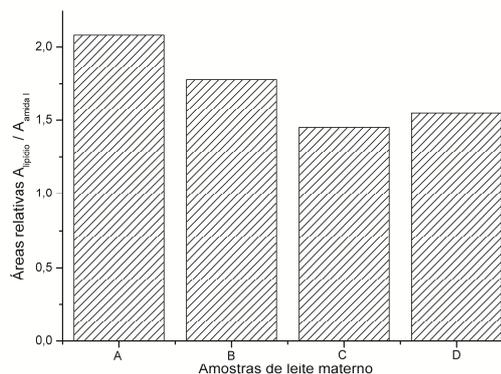


Figura 3- Áreas relativas entre lipídios e proteínas;

Os resultados mostram uma variação significativa nos componentes das amostras A, B, C e D, como pode ser observado nas figuras 3 e 4.

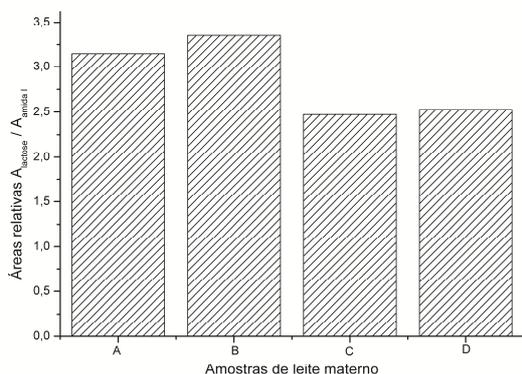


Figura 4- Áreas relativas entre lactose e proteínas

## Discussão

Os resultados mostram as diferentes concentrações de lipídios, proteínas e lactose que são as principais componentes do leite humano nas quatro amostras analisadas. Essas diferenças foram observadas nos espectros juntamente com os cálculos de áreas relativas e dendrograma obtido a partir da análise estatística multivariada.

Macy e colaboradores citados por Lamounier, Vieira e Gouveia (2009) mencionaram que há individualidade de composição no leite de cada mulher e que foram observadas variações na composição no leite de uma mesma mulher de um dia para o outro ou até mesmo de um horário para outro.

Stuart (1997) apresenta a eficácia da espectroscopia no infravermelho para caracterizar biomoléculas e que sua afirmação poderia concordar com os resultados obtidos do estudo de leite humano.

## Conclusão

Verificou-se que a espectroscopia vibracional no Infravermelho é bastante útil para analisar as amostras de leite humano bem como caracterizar os principais componentes do leite humano, lipídios, amida I da proteína e lactose. Foi possível realizar a análise quantitativa em termos de percentagem das variações de concentrações de biomoléculas nas amostras diferentes de leite materno.

## Agradecimentos

Um dos autores (P. M. S) agradece uma bolsa de estudos concedida pela FVE.

## Referências

- EVERITT, B. S., **Statistical Methods for Medical Investigations**. 2.ed. London: Edward Arnold, 1994. 156p.

- GIUGLIANI, E. R. J. Amamentação exclusiva. In: CARVALHO, M. R; TAMEZ, R, N. **Amamentação: bases científicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

- JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 3. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 642p.

- LAMOUNIER, J. A; VIEIRA, G. O; GOUVÊA, I. C. Composição do Leite Humano – Fatores nutricionais. In: **Aleitamento Materno**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

- MANTSCH, H. H.; CHAPMAN, D. **Infrared Spectroscopy of Biomolecules**. John Wiley & Sons, 1996, 203p.

- MOURA, E. C. Nutrição. In: CARVALHO, M. R; TAMEZ, R, N. **Amamentação: bases científicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

- NOBREGA, F. J. A importância Nutricional do Leite Materno. In: **Aleitamento Materno**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

- REGO, J. D. **Aleitamento Materno / Um guia para pais e familiares**. 2 ed. Sao Paulo: Atheneu, 2008.

- SANTOS, P. M. Diferenciação de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis* através de Microespectroscopia (FT-IR) e análise estatística multivariada. 2011. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2011.

- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Livros Tecnicos e Científicos, 2005.

- STUART, B. **Biological Applications of infrared Spectroscopy**. Baffins Lane: John Wiley & Sons, 1997.

- WARD, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**, v.58, p.236-244, 1963.