

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

**NADINE RODRIGUES MARTONI**

**ESTUDO DE DESEMPENHO DE METODOLOGIA PARA  
DETERMINAÇÃO RÁPIDA E SIMULTÂNEA DE ACIDEZ TITULÁVEL E  
PROTEÍNA EM LEITE HUMANO**

Juiz de Fora

2026

Nadine Rodrigues Martoni

**Estudo de desempenho de metodologia para determinação rápida e simultânea de acidez titulável e proteína em leite humano**

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

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Aglaê Martins Teodoro

Coorientadoras: Profa. Dra. Gisela de Magalhães Machado Moreira  
Profa. Dra. Denise Sobral

Juiz de Fora

2026

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

Rodrigues Martoni, Nadine.

Estudo de desempenho de metodologia para determinação rápida e simultânea de acidez titulável e proteína em leite humano / Nadine Rodrigues Martoni. -- 2026.

55 f.

Orientador: Vanessa Aglaê Martins Teodoro

Coorientadores: Denise Sobral, Gisela de Magalhães Machado Moreira

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2026.

1. Controle de qualidade. 2. Formaldeído. 3. Neonatos. 4. Proteína total. I. Aglaê Martins Teodoro, Vanessa, orient. II. Sobral, Denise, coorient. III. de Magalhães Machado Moreira, Gisela, coorient. IV. Título.

**Nadine Rodrigues Martoni**

**Estudo de desempenho de metodologia para determinação rápida e simultânea de acidez titulável e proteína em leite humano**

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

Aprovada em 29 de abril de 2026.

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Vanessa Aglaê Martins Teodoro** - Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

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

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

**Prof. Dr. Fabiano Freire Costa**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Juliana de Cássia Gomes Rocha**  
EPAMIG/ILCT

Juiz de Fora, 24/04/2026.



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Aglaê Martins Teodoro, Professor(a)**, em 30/04/2026, às 07:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denise Sobral, Usuário Externo**, em 30/04/2026, às 08:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiano Freire Costa, Professor(a)**, em 30/04/2026, às 08:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Cássia Gomes Rocha Lelis, Usuário Externo**, em 30/04/2026, às 10:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **GISELA DE MAGALHAES MACHADO MOREIRA, Usuário Externo**, em 30/04/2026, às 14:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Dedico este trabalho à minha família,  
especialmente à minha mãe, base e  
porto seguro, às pessoas que  
acreditaram em mim, mesmo quando  
eu duvidei, a Oxalá e à espiritualidade  
amiga que me sustentaram com força,  
discernimento e proteção ao longo de  
toda essa jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

A construção desta dissertação representa mais do que a conclusão de uma etapa acadêmica; simboliza um processo de crescimento pessoal, amadurecimento e superação. Ao longo dessa trajetória, muitas pessoas foram fundamentais, e a elas registro minha profunda gratidão.

Agradeço, primeiramente, a Oxalá e à espiritualidade que me sustentaram nos momentos de incerteza, renovando minha força e minha fé sempre que o caminho parecia difícil. Mesmo em dias desafiadores eu nunca estive sozinha.

À minha família, especialmente minha mãe, meu alicerce e porto seguro, agradeço pelo amor incondicional, pelo incentivo constante e pela compreensão diante das ausências necessárias para a dedicação a este trabalho. Cada palavra de apoio foi essencial para que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora e coorientadoras, pela condução firme e sensível deste trabalho, pelas contribuições valiosas, disponibilidade e confiança depositada em mim. Suas orientações foram essenciais para o amadurecimento científico, construção do olhar crítico e para a qualidade desta pesquisa.

Aos professores do programa, que contribuíram significativamente para minha formação acadêmica e científica, fortalecendo minha trajetória profissional.

Aos colegas da sala 2, das turmas do mestrado e de laboratório, pelas trocas de conhecimento, pelo apoio mútuo e momentos compartilhados, que tornaram essa caminhada mais leve e enriquecedora.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa, seja com palavras de incentivo, auxílio técnico, apoio emocional ou simplesmente acreditando em mim, deixo aqui minha sincera gratidão.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de pesquisa e pelo financiamento do projeto.

## RESUMO

O leite humano (LH) é o alimento mais adequado para recém-nascidos, especialmente prematuros e de baixo peso, por apresentar composição nutricional e imunológica singular. Nos bancos de leite humano (BLH), o controle de qualidade do LH doado é essencial para garantir segurança sanitária e adequada destinação nutricional aos lactentes. Entretanto, embora sejam realizadas análises para controle de qualidade rotineiramente na triagem do leite, a quantificação de proteína total ainda não integra a rotina dos BLH, devido à complexidade, tempo de execução, custo e necessidade de infraestrutura laboratorial associados aos métodos de referência, como o *Kjeldahl*. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo estudar o desempenho de uma metodologia analítica rápida para determinação simultânea de acidez titulável e proteína total em LH, aplicável à rotina dos BLH. Para isso, foi utilizado o método do formaldeído (Sørensen) adaptado para LH, com miniaturização da técnica e integração à análise de acidez Dornic. Inicialmente, foram analisadas 196 amostras de LH em duplicata, empregando-se o método do formol adaptado e o método de *Kjeldahl*, com obtenção de modelo de regressão linear estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), possibilitando a predição do teor de proteína (%) a partir do volume de solução Dornic consumido após adição de formaldeído. Posteriormente, a metodologia foi adequada às condições operacionais dos BLH, com emprego de materiais e procedimentos compatíveis à sua rotina, e aplicada em 78 amostras de LH, também em duplicata, com comparação simultânea ao método de *Kjeldahl* para avaliação de aplicabilidade e concordância. Os resultados demonstraram que o método adaptado apresentou viabilidade analítica e potencial de incorporação à rotina dos BLH, por permitir a estimativa do teor de proteína total de forma rápida, simples, com baixo custo operacional e sem consumo adicional de amostra, representando uma alternativa promissora para aprimorar a triagem e a destinação nutricional do LH doado.

**Palavras-chave:** Controle de qualidade; Formaldeído; Neonatos; Proteína total.

## ABSTRACT

Human milk (HM) is the most appropriate food for newborns, especially preterm and low birth weight infants, due to its unique nutritional and immunological composition. In human milk banks (HMBs), quality control of donated HM is essential to ensure sanitary safety and appropriate nutritional allocation for infants. However, although routine analyses are performed during milk screening, the quantification of total protein is not yet part of HMB routine practice, due to the complexity, time requirements, cost, and laboratory infrastructure associated with reference methods such as the *Kjeldahl* method. In this context, the present study aimed to evaluate the performance of a rapid analytical methodology for the simultaneous determination of titratable acidity and total protein in HM, applicable to HMB routine. For this purpose, the formaldehyde (Sørensen) method adapted for HM, as described by Quirino (2022), was used, with miniaturization of the technique and integration into Dornic acidity analysis. Initially, 196 HM samples were analyzed in duplicate using both the adapted formaldehyde method and the *Kjeldahl* method, resulting in a statistically significant linear regression model ( $p < 0.05$ ), enabling the prediction of protein content (%) based on the volume of Dornic solution consumed after formaldehyde addition. Subsequently, the methodology was adjusted to HMB operational conditions, using materials and procedures compatible with routine practice, and applied to 78 HM samples, also in duplicate, with simultaneous comparison to the *Kjeldahl* method to assess applicability and agreement. The results demonstrated that the adapted method showed analytical feasibility and potential for incorporation into HMB routine, as it allows rapid, simple, and low-cost estimation of total protein content without additional sample consumption, representing a promising alternative to improve screening and nutritional allocation of donated HM.

**Keywords:** Quality control; Formaldehyde; Neonates; Total protein

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Evolução do número de bancos de leite humano no Brasil entre 2000 e 2023 .....	24
Figura 2 - Fluxograma representando o trajeto do leite humano desde a seleção das doadoras até a distribuição aos recém-nascidos .....	25
Figura 3 - Ponto final da reação entre o titulante alcalino padrão e os constituintes ácidos presentes no leite humano .....	31
Figura 4 - Fluxograma esquemático de preparo de amostras e de análises pelos métodos de Kjeldahl e formol adaptado.....	40
Figura 5 - Acidímetro empregado para análise de leite humano nos bancos de leite humano.....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teores de proteína, gordura e lactose do colostro, do leite de transição e do leite humano maduro .....	18
Tabela 2 - Parâmetros de conformidade de leite humano doado previstos na RDC 918/2024.....	27
Tabela 3 - Valores (%) de proteína pelo método Kjeldahl e formol adaptado utilizando a fórmula proposta na regressão linear da Fase 1.....	46

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Modelo de regressão linear do teor de proteína (%) em função do volume de solução Dornic (mL) gasto na titulação após reação com o formol em leite humano..... 43

Gráfico 2 - Teste de Bland-Altman para avaliação da concordância entre os métodos de kjeldahl e formol adaptado..... 46

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Adaptação do método do formol tradicional para uso em leite humano .....	36
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ARA – Ácido araquidônico  
BLH – Banco de Leite Humano  
DHA - Ácido docosa-hexaenoico  
DIN - Diâmetro nominal  
IFF – Instituto Fernandes Figueira  
IgA - Imunoglobulina Secretória  
LH – Leite Humano  
N - Normal  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PCLH – Posto de Coleta de Leite Humano  
rBLH-BR - Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano  
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada  
RN – Recém-nascido  
UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
3.1 ASPECTOS NUTRICIONAIS DO LH .....	18
<b>3.1.1 Proteínas do leite humano</b> .....	<b>21</b>
3.2 REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO .....	22
3.3 COLETA, TRANSPORTE E PROCESSAMENTO DO LEITE HUMANO	24
3.4 CONTROLE DA QUALIDADE DO LEITE HUMANO EM BANCOS DE LEITE .....	27
<b>3.4.1 Determinação de acidez no leite humano</b> .....	<b>30</b>
3.5 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA EM LEITE .....	31
<b>3.5.1 Método do formaldeído ou método de sørensen</b> .....	<b>33</b>
3.6 PERSPECTIVA DE USO DO MÉTODO DE FORMOL PARA ANÁLISE DE PROTEÍNA EM BANCOS DE LEITE HUMANO .....	35
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	38
4.2 SELEÇÃO DE AMOSTRAS E LOCALIZAÇÃO .....	38
4.3 MÉTODOS DE ANÁLISES .....	39
4.4 VIDRARIAS, EQUIPAMENTOS E REAGENTES .....	41
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
5.1 FASE 1: DETERMINAÇÃO DA EQUAÇÃO DE LINEARIDADE .....	43
5.2 FASE 2: DESEMPENHO DO MÉTODO EM CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE BANCOS DE LEITE HUMANO .....	45
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O leite humano (LH) possui composição única, rica em componentes que desempenham papel crucial na proteção do organismo infantil, como agentes antimicrobianos, substâncias anti-inflamatórias e leucócitos. Esses elementos contribuem diretamente para o desenvolvimento do sistema imunológico do recém-nascido, tornando o LH essencial à saúde nos primeiros meses de vida (Meek; Noble, 2022). Ao nascimento, o sistema imunológico do bebê é imaturo e o trato gastrointestinal ainda não possui microbiota nem mecanismos eficazes de eliminação de patógenos. Nesse contexto, o LH é considerado o alimento mais adequado, uma vez que reúne todos os nutrientes essenciais à sua proteção (Fernandes; Moreira, 2020).

Alguns neonatos apresentam necessidades nutricionais específicas devido à condição de saúde prematura e baixo peso. Esses bebês, que se encontram em situação hospitalar, dependem exclusivamente de LH doado para o sucesso do crescimento e desenvolvimento fisiológico. O LH doado é previamente selecionado pelo controle de qualidade dos bancos de leite humano (BLH) para então passarem pelo processamento. A seleção do LH doado consiste em etapas que vão desde a triagem da doadora, até a análise de qualidade do LH doado realizada pelos laboratórios dos BLH. (Schiesel *et al.*, 2021).

A realização do controle de qualidade no LH doado é importante para garantir a segurança do alimento e o aporte nutricional necessário ao neonato, uma vez que a composição pode variar entre doadoras e até mesmo para a mesma doadora em diferentes estágios de lactação. A partir dos resultados das análises, é possível direcionar cada lote para o grupo de neonatos que mais se beneficiará daquela composição específica, permitindo o uso eficiente do LH doado.

Apesar da importância dessas análises, a avaliação nutricional realizada na rotina da maioria dos BLH ainda apresenta limitações, pois se baseia apenas no crematócrito, análise que fornece uma estimativa indireta do conteúdo energético do leite com base na medida do teor de creme. Nesse contexto, a determinação do teor de proteína torna-se igualmente essencial para a adequada classificação e destinação do LH, sobretudo por sua importância para

o crescimento, desenvolvimento e a proteção imunológica de recém-nascidos, especialmente os prematuros e de baixo peso, que apresentam maiores demandas nutricionais e maior vulnerabilidade clínica (Di Marzo; Pranata; Barbano, 2021).

A determinação do teor de proteínas em leite de diferentes espécies é tradicionalmente realizada pelos métodos *Kjeldahl*, colorimétricos e instrumentais. Apesar de serem métodos com elevada precisão, demonstram alto custo para a maioria dos BLH brasileiros (Araujo, 2023). A complexidade, o custo e o tempo envolvidos nesses métodos, inviabilizam a quantificação do teor de proteína do LH durante a rotina de seleção nos BLH. Sendo assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento de alternativas analíticas que sejam acessíveis, rápidas, confiáveis e de fácil aplicação na rotina dos BLH, sem utilização de uma quantidade de amostra que comprometa o volume a ser disponibilizado ao neonato. Tais soluções são essenciais para fortalecer as rotinas de controle de qualidade dos BLH, e melhor direcionamento do alimento a depender da condição clínica do paciente.

A análise da acidez Dornic, além de avaliar a qualidade do LH doado, permite direcionar o leite conforme as necessidades específicas dos neonatos, visto que, quanto maior a acidez, menor a biodisponibilidade de cálcio e fósforo (BLH-IFF/NT 29.21, 2021). Caso o leite não seja corretamente manipulado e armazenado, ocorre aumento da carga microbiana que leva à fermentação da lactose, com produção de ácido láctico. Isso eleva a acidez e compromete o valor nutricional e imunológico do leite cru, em função do consumo de nutrientes pela microbiota contaminante e da alteração na absorção de sais minerais, decorrente da mudança na osmolaridade (Oliveira; Lopes-Júnior; Sousa, 2022; BLH-IFF/NT 29.21, 2021; Silva, 2004).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo o estudo de desempenho de uma metodologia analítica para determinação rápida e simultânea da acidez titulável e do teor de proteínas em amostras de LH, sem aumentar o volume de LH doado utilizado para a realização das análises. A proposta visa disponibilizar uma solução prática e eficiente para a triagem nas rotinas dos BLH, contribuindo para a segurança alimentar dos recém-nascidos com a adequada destinação do alimento e otimização da taxa de aproveitamento do LH doado.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o desempenho de uma metodologia analítica rápida para determinação simultânea de acidez titulável e de proteína total em leite humano, aplicável na rotina de bancos de leite humano.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Construir um modelo de regressão linear para predição do teor de proteína total (%) a partir do volume de solução Dornic consumido após adição de formaldeído.
- Adequar a aplicação da metodologia às condições operacionais da rotina dos bancos de leite humano;
- Avaliar a precisão e a concordância entre a metodologia rápida e o método de referência em amostras de leite humano analisadas em duplicata.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ASPECTOS NUTRICIONAIS DO LH

A Organização Mundial de Saúde (OMS), o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e o Ministério da Saúde recomendam a amamentação exclusiva até os seis meses de idade, devido a sua importância para a sobrevivência, crescimento, desenvolvimento, saúde e nutrição de neonatos. O LH possui uma composição única, com a presença de água, lactose, gorduras, sais minerais, linfócitos, fatores de crescimento, anticorpos, carboidratos e proteínas que nutrem, fornecem energia e auxiliam na proteção do lactente, uma vez que a imaturidade imunológica o torna mais propício a infecções. Além disso, o LH orienta o desenvolvimento do bebê auxiliando na construção de tecidos o que torna indispensável o fortalecimento conferido pelo aleitamento.(Ballard; Morrow, 2013; Meek; Noble, 2022; Silva *et al.*, 2020).

Sua composição é dinâmica ao longo do tempo de lactação (colostro, transição e maduro) e personalizada de acordo com as características maternas, do lactente, idade gestacional e porção da mamada (início ou fim) (Silva *et al.*, 2020). A Tabela 1 apresenta a composição média dos principais nutrientes do colostro, do leite de transição e do leite maduro.

Tabela 1 - Teores de proteína, gordura e lactose do colostro, do leite de transição e do leite humano maduro

Estágio (tempo de lactação)	Proteínas (g/100 mL)	Gordura (g/100 mL)	Lactose (g/100mL)
Colostro (0 a 5 dias)	1,5 - 8,0	1,8 - 4,5	4,5 - 6,5
Leite de transição (6 a 15 dias)	1,1 - 2,4	2,6 - 5,6	4,8 - 7,4
Leite maduro (≥ 16 dias)	0,9 - 2,3	2,8 - 4,8	6,8 - 7,7

Fonte: adaptado de Baldeón; Flores (2021); Khanna *et al.* (2022); Samuel *et al.* (2020).

Nos primeiros sete dias de vida do bebê, a mãe produz o colostro, em menor quantidade, cor amarelada, alta densidade, rico em minerais, proteínas,

imunoglobulinas, antioxidantes, leucócitos e pobre em lactose e gorduras (Fernandes; Moreira, 2020). O colostro é rico em proteínas e componentes que contribuem para a imunidade, como a imunoglobulina secretória (IgA), lactoferrina, leucócitos e fatores de desenvolvimento, como o fator de crescimento epidérmico e pobre em gordura. Essa composição indica que, além da importância com o aporte nutricional, nessa fase de lactação o bebê necessita prioritariamente da proteção imunológica.(Yi; Kim, 2021). Além disso, o colostro contribui para a proteção do trato gastrointestinal do bebê e auxilia na passagem do mecônio (Santos, 2021; Silva *et al.*, 2020).

À medida que ocorre o estreitamento das junções celulares do epitélio da glândula mamária, a proporção de sódio e potássio diminui e a concentração de lactose e de gordura aumenta indicando o início da produção do leite de transição a partir do sexto dia até o décimo dia pós-parto com grande importância ao suporte nutricional e desenvolvimento infantil (Ballard; Morrow, 2013).

O leite maduro, que surge aproximadamente duas semanas após o parto, possui, aproximadamente, 87 % de água e 13 % de sólidos. Em média, apresenta 7 % de lactose, principal carboidrato presente no LH, que confere energia ao lactente e faz parte do processo de absorção de cálcio; 3,5 a 4 % de gordura; e 0,8 a 1,2 % de proteína total, vitaminas e minerais em concentrações adequadas ao desenvolvimento do bebê (Ballard; Morrow, 2013; Silva *et al.*, 2020). Ao longo dos meses, com a produção do leite maduro, a proteína no leite apresenta uma redução nos níveis e a gordura tende a subir ligeiramente garantindo manutenção do desenvolvimento físico e neurológico (Ballard; Morrow, 2013).

As proteínas são divididas em caseínas,  $\alpha$  lactalbumina, lactoferrina, beta-lactoglobulina, imunoglobulinas (IgA), lisozima, fatores de crescimento e albumina sérica. O teor de proteína no LH não é afetado diretamente pela dieta materna, mas varia de acordo com idade gestacional, em que o leite obtido de mães que tiveram parto prematuro é significativamente maior do que o das mães que tiveram parto a termo. Além disso, está presente em menor concentração no leite de mães com maior volume de produção (Ballard; Morrow, 2013; Petersohn *et al.*, 2024).

As proteínas do LH favorecem o sistema imunológico do neonato com a função de proteger a mucosa intestinal que consiste de uma microbiota ainda

em desenvolvimento, além de contribuir para o transporte de cálcio e ferro. A lactoferrina, em concentrações mais elevadas no colostro quando comparado ao leite maduro, exerce função de estimular a proliferação celular, desempenhar ação anti-inflamatória e prevenir doenças infecciosas (Silva *et al.*, 2020).

A gordura, principal componente energético, é rica em triacilgliceróis e ácidos graxos poli-insaturados, como oleico, linoleico, ácido docosa-hexaenoico (DHA) e ácido araquidônico (ARA); possui teor variável, segundo a dieta materna e reservas corporais durante a fase da amamentação; e são fundamentais para o desenvolvimento neurológico e visual, bem como para modular o metabolismo lipídico, a deposição de gordura e a microbiota intestinal do RN (Butts *et al.*, 2018; Petersohn *et al.*, 2024).

A lactose, carboidrato mais abundante no LH, fornece grande parte da energia do leite, contribui para a osmolaridade e, após ser hidrolisada em glicose e galactose, apoia o crescimento, metabolismo e desenvolvimento cerebral do RN. Além da lactose, o LH é rico em oligossacarídeos (HMO), que são carboidratos complexos não digeríveis pelo bebê. Esses carboidratos não servem primariamente como “caloria”, mas como prebióticos e moléculas bioativas as quais alimentam seletivamente bifidobactérias benéficas, modulam a microbiota intestinal, inibem a ligação de patógenos ao epitélio intestinal, fortalecem a barreira intestinal e participam da modulação imune (Schenk *et al.*, 2025; Urashima *et al.*, 2025).

As vitaminas e minerais do LH são micronutrientes essenciais para o crescimento e a saúde do bebê, fornecidos em quantidades ajustadas às necessidades do RN. O leite contém vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e hidrossolúveis (complexo B e vitamina C), além de minerais como cálcio, fósforo, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro, cobre, iodo e selênio. A composição de micronutrientes é dinâmica e modulada por fatores como estágio da lactação e, em especial para as vitaminas A, D, C e algumas do complexo B, pela dieta e suplementação materna (Petersohn *et al.*, 2024).

Além dos macronutrientes, micronutrientes e compostos bioativos presentes no LH, ele também contém microbiota própria que auxiliam na colonização do intestino do bebê, além da presença de células epiteliais, células imunes, células-tronco, e de vesículas extracelulares e microRNAs que

participam da imunoproteção e da programação do desenvolvimento infantil (Yi; Kim, 2021).

### 3.1.1 PROTEÍNAS DO LEITE HUMANO

Para RN prematuros e lactentes de baixo peso com necessidades nutricionais altas, a proteína do LH é capaz de fornecer aminoácidos essenciais para síntese tecidual, crescimento e desenvolvimento neurológico e, principalmente, na atuação em funções imunológicas por meio do aporte de imunoglobulinas, lactoferrina, lisozima e fatores de crescimento (Vieira *et al.*, 2004).

A intensa atividade anabólica do recém-nascido, diferente de qualquer outro período de sua vida, requer uma oferta adequada de proteínas nos primeiros seis meses (Vieira *et al.*, 2004). As proteínas desempenham papel importante para os recém-nascidos a termo, pré-termo e lactentes; sua atuação se desdobra em função enzimática e metabólica, transporte e síntese de componentes, além de atuarem como agentes anti-infecciosos e imunomoduladores (Calil; Falcão; 2003).

Em crianças, a proteína é essencial no crescimento e desenvolvimento, especialmente nos primeiros anos de vida, período caracterizado por intensa multiplicação celular, maturação de tecidos e órgãos (Yi; Kim, 2021). A proteína é um macronutriente essencial no desenvolvimento físico e cognitivo além de estar diretamente relacionada ao fortalecimento do sistema imunológico e aporte para crescimento (Calil; Falcão, 2003).

A proteína do leite pode ser dividida entre soroproteína e caseína. O LH, diferente das demais matrizes, possui sua proporção soroproteína x caseína em 80:20 na fase de colostro tendendo a atingir 50:50 quando no estágio de leite maduro. Essa característica favorece a digestibilidade e a absorção, tornando o LH mais facilmente assimilável pelo sistema digestório imaturo do recém-nascido (Calil; Falcão, 2003).

Além das proteínas do soro, como a alfa-lactalbumina, a lactoferrina, a lisozima, a soroalbumina, as imunoglobulinas e a beta-lactoglobulina, também está presente no LH, embora em menor proporção no início da lactação, a caseína (Calil; Falcão, 2003). A caseína forma micelas com cálcio e fósforo,

facilitando o transporte desses minerais e contribuindo para sua biodisponibilidade, além de influenciar características físicas do leite, como sua coloração e digestibilidade. A baixa concentração de caseína no LH favorece a formação de um coágulo gástrico mais leve, de digestão mais fácil e esvaziamento gástrico mais rápido (Calil; Falcão, 2003; Silva *et al.*, 2007)

Outro aspecto relevante das proteínas do LH é sua função bioativa, que vai além do valor nutricional. Diversas proteínas atuam como agentes de defesa, como a lactoferrina, que possui ação bacteriostática ao sequestrar ferro, e a lisozima, que exerce atividade bactericida (Calil; Falcão, 2003). As imunoglobulinas, especialmente a IgA secretora, desempenham papel essencial na proteção das mucosas, impedindo a adesão de microrganismos e neutralizando toxinas, sendo particularmente abundantes no colostro (Cabral *et al.*, 2023)

Os aminoácidos essenciais de alto valor biológico mais importantes presentes no LH são cistina e taurina que contribuem para o desenvolvimento do sistema nervoso central, fator importante pois o RN não consegue sintetizá-los a partir de outros aminoácidos devido à deficiência enzimática (Silva *et al.*, 2007)

Além das funções imunológicas, as proteínas e peptídeos do LH também apresentam propriedades reguladoras e tróficas. Fatores de crescimento, hormônios e peptídeos bioativos contribuem para a maturação do trato gastrointestinal, modulação do sistema imune e desenvolvimento global do RN (Calil; Falcão, 2003).

### 3.2 REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO

O BLH é um serviço de atenção à saúde para promoção do aleitamento materno, coleta, processamento, controle de qualidade e distribuição do LH doado aos bebês, cujas mães não estejam produzindo leite suficiente, de acordo com as necessidades do RN (Brasil, 2024). O funcionamento adequado dos BLH é fundamental para que bebês prematuros ou com condições médicas que dificultam a amamentação tenham acesso ao LH doado de qualidade, garantindo seu desenvolvimento saudável (Fonseca *et al.*, 2021).

O posto de coleta de leite humano (PCLH) é uma unidade, fixa ou móvel, intra ou extra-hospitalar, vinculada ao BLH e a um serviço de saúde, responsável por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno e execução de atividades de coleta da produção láctea da nutriz e sua estocagem. Deve possuir licença de funcionamento, licença sanitária ou alvará sanitário em vigor, emitido pelo órgão de vigilância sanitária competente, bem como dispor de profissionais de nível superior legalmente habilitados e capacitados para assumir a responsabilidade médico-assistencial e de tecnologia de alimentos, além da responsabilidade técnica perante a vigilância sanitária (Brasil, 2024).

A Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (rBLH-BR) é a maior e mais complexa do mundo, criada em 1998 como uma iniciativa do Ministério da Saúde em conjunto à Fiocruz (IFF/Fiocruz) dentro do Sistema Único de Saúde (SUS). É descrita como “a maior e mais bem estruturada rede de bancos de leite humano do mundo” e conta com mais de 230 BLH e 240 PCLH em todos os Estados, focada em promoção do aleitamento, coleta, processamento, controle de qualidade e distribuição de LH, reduzindo a mortalidade infantil (Brasil, 2017; Carrijo *et al.*, 2022).

No Brasil, o primeiro BLH surgiu em 1943 com o intuito de coletar e distribuir LH, a fim de atender a casos especiais, e ganhou força com o avanço dos estudos. Na época, o cenário demonstrava que 85% dos casos de mortalidade por desnutrição ocorriam devido à alimentação artificial de neonatos, evidenciando uma real necessidade de dispor de quantidades maiores de LH. A realidade brasileira dos BLH vem sendo modificada com a expansão do número de unidades, bem como com o aumento no rigor em relação aos produtos e processos, uma vez que o receptor é especialmente vulnerável (Brasil, 2008). A Figura 1 apresenta a evolução do número de BLH no Brasil, entre os anos de 2000 e 2023.

A saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos, e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação (Brasil, 1988). Cabe ao SUS, dentre outras atribuições, fiscalizar e inspecionar os alimentos em geral, bem como o LH doado aos BLH e o controle do seu teor nutricional (Brasil, 1988).

Figura 1 - Evolução do número de bancos de leite humano no Brasil entre 2000 e 2023



Fonte: Fiocruz (2026)

Essas doações foram cruciais no aumento das chances de recuperação de mais de 219 mil recém-nascidos prematuros e de baixo peso internados em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal em todo o País (Brasil, 2025).

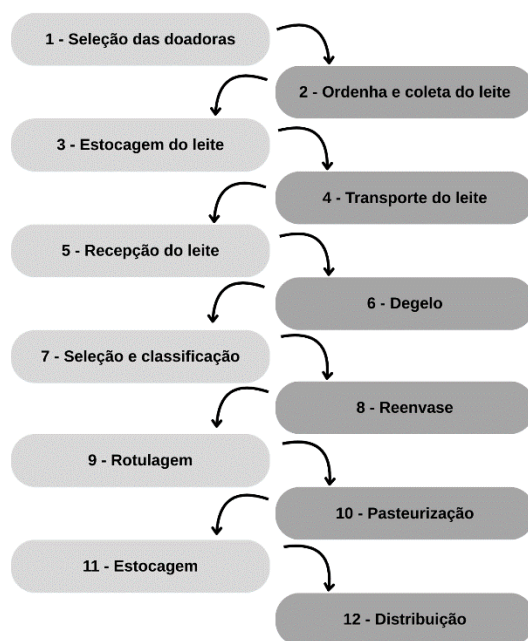
### 3.3 COLETA, TRANSPORTE E PROCESSAMENTO DO LEITE HUMANO

Até os anos 80, o LH era coletado pelos BLH de forma mecânica e distribuído cru. Com o aumento do volume de coleta do leite e a expansão das unidades, a partir de 1985, fez-se necessário adotar medida de tratamento térmico do LH doado. O Grupo Técnico dos BLH produziu o primeiro documento oficial de recomendações técnicas, o que permitiu a construção progressiva, o desenvolvimento tecnológico e a otimização das condições operacionais dos BLH, uma vez consolidados os cuidados necessários para garantir a segurança do alimento (Brasil, 2008).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 918, de 19 de setembro de 2024 (RDC 918/2024), aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fornece diretrizes para a coleta, processamento e distribuição do LH doado, visando assegurar sua qualidade físico-química, sensorial e

microbiológica (Brasil, 2024). A confiabilidade das análises é ponto crucial, uma vez que a presença de alterações ou contaminações pode comprometer não apenas a eficácia nutricional do leite, mas também a saúde dos neonatos, que são vulneráveis a infecções e outras complicações (Lepilkina; Grigorieva; Guseva, 2024). A Figura 2 representa, por meio de fluxograma, o trajeto do LH desde a seleção das doadoras até a distribuição aos RN.

Figura 2 - Fluxograma representando o trajeto do leite humano desde a seleção das doadoras até a distribuição aos recém-nascidos



Fonte: Adaptado de (Brasil, 2008)

Para a seleção das doadoras, são consideradas as lactantes saudáveis que apresentam produção láctica superior às necessidades do filho, que não sejam portadoras de doenças que impeçam a doação e amamentação e as que se dispõem a doar o excedente por livre e espontânea vontade (Brasil, 2024). As doadoras são orientadas pelos BLH e pelos PCLH quanto à importância e forma de doação do LH. É realizada uma triagem por um profissional qualificado e vinculado ao BLH para seleção da doadora, que será acompanhada a partir da primeira doação (Brasil, 2008).

As embalagens destinadas ao acondicionamento do LH doado devem ser feitas com material inerte e inócuo mesmo quando exposto a temperaturas entre

-25 °C a 128 °C, possuir tampa plástica rosqueável com vedamento perfeito, ser de fácil higienização e esterilização, com boca larga, baixo custo e com volume de capacidade de armazenamento entre 50 e 500 mL. (BLH-IFF/NT 29.21, 2021).

A ordenha deve ser realizada em ambiente tranquilo, manualmente. A doadora não pode usar perfumes e deve manter os cabelos presos; as mamas devem ser lavadas apenas com água e os primeiros jatos de leite (aproximadamente 1 mL) devem ser desprezados; ao final da ordenha, o frasco deve ser identificado com nome, período de lactação e data da ordenha e então congelado por um prazo não superior a 15 dias da data da primeira ordenha (Brasil, 2008).

Para o transporte do leite é importante a manutenção da temperatura da cadeia de frio visando à preservação da qualidade microbiológica até a recepção nos BLH. As etapas seguintes consistem no degelo realizado em banho maria a uma temperatura de 40 °C, na seleção, onde serão avaliadas, dentre outras, as condições da embalagem, a presença sujidades no leite e na classificação do LH, quando serão realizados testes para verificação de conformidade com os padrões de qualidade (Brasil, 2008).

Após ser selecionado e classificado quanto ao período de lactação, o LH segue para a etapa de reenvase e rotulagem para então ser pasteurizado sob uma temperatura de 62,5 °C por 30 minutos, o qual objetiva inativar microrganismos patogênicos e reduzir deteriorantes que possam estar presentes por contaminação primária ou secundária (Brasil, 2008).

Os BLH e os PCLH devem dispor de normas e rotinas de todos os procedimentos realizados devidamente escritas, além de implantar e implementar boas práticas de manipulação com atenção à higiene e conduta, seleção de doadoras e doações, corretas ordenha e coleta, cuidados com a cadeia de frio, transporte, recepção e processamento, de forma a manter as características físico-químicas, microbiológicas, químicas e imunológicas do LH (Brasil, 2024).

### 3.4 CONTROLE DA QUALIDADE DO LEITE HUMANO EM BANCOS DE LEITE

O funcionamento adequado dos BLH é fundamental para que bebês prematuros ou com condições médicas que dificultam a amamentação tenham acesso ao LH doado de qualidade, garantindo seu desenvolvimento saudável (Fonseca *et al.*, 2021).

O LH ordenhado é um alimento que não possui proteção que impeça o acesso da microbiota aos seus nutrientes, podendo ser fonte de microrganismos patogênicos, se não for manipulado sob condições adequadas (Brasil, 2008). Assim, com o objetivo de garantir a segurança sanitária do LH ordenhado, o Ministério da Saúde estabeleceu requisitos para instalação e funcionamento de BLH, por meio da RDC 918/2024.

O controle de qualidade dos BLH deve possuir manuais de boas práticas de manipulação do LH ordenhado e programa interno de qualidade documentado e monitorado seguindo os parâmetros de conformidade previstos na legislação (Brasil, 2024). As análises que devem ser realizadas para seleção do LH doado estão elencadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros de conformidade de leite humano doado previstos na RDC 918/2024

<b>Característica</b>	<b>Padrão aceitável</b>
Acidez Dornic	Menor ou igual a 8 °D
<i>Off-flavor</i>	Ausente
Sujidade	Ausente
Cor (vermelho/marrom)	Ausente
Conteúdo energético (Crematócrito)	Maior ou igual a 250 kcal/L
Microrganismos do Grupo Coliforme	Ausente

Fonte: Adaptado de Brasil (2024)

As análises de seleção visam identificar o LH que não atenda aos parâmetros de qualidade necessários à sua utilização, sendo assim descartado, além de evidenciar problemas na ordenha e na estocagem do leite (Schuessel *et al.*, 2021). Os resultados das análises do LH doado, aliados à rastreabilidade e

à identificação de causas de descarte, podem aumentar o aproveitamento do leite, diminuindo as perdas por inadequações (Grazziotin; Grazziotin; Letti, 2010), por meio da aplicação de ações corretivas e de prevenção em toda a cadeia.

### *Flavor*

O LH apresenta grande capacidade de absorção de substâncias voláteis que são incorporadas ao seu aroma original (Souza *et al.*, 2023). A percepção concomitante entre odor e sabor é denominada de *flavor*. O LH ordenhado possui um *flavor* primário, caracterizado pela relação entre cloreto, lactose e ácidos graxos; e um *flavor* secundário, decorrente de alterações devido à incorporação de substâncias químicas voláteis ou ao desenvolvimento microbiano indesejável (BLH-IFF/NT 26.21, 2021b).

A determinação do *off-flavor* é realizada por meio de método sensorial por analistas capacitados, e consiste em um importante instrumento na detecção de não conformidades no LH. O *off-flavor* torna o LH impróprio para consumo, por ser ocasionado por alterações físico-químicas em sua composição. A depender do tipo de deterioração, o *off-flavor* remete a odores específicos, como de ranço, de sabão de coco ou de manteiga, provenientes da hidrólise de lipídios pela presença de microrganismos lipolíticos; odores de peixe, de ovo podre ou de amônia são provenientes da hidrólise de proteínas pela presença de microrganismos proteolíticos; e o odor de iogurte provém da fermentação da lactose. Outros odores não convencionais em LH podem ocorrer devido à capacidade de sorção de compostos voláteis (BLH-IFF/NT 26.21, 2021b).

Existe uma relação consistente entre a presença de *off-flavor* e elevadas contagens de microrganismos nas amostras analisadas, o que reforça a importância da pesquisa de *off-flavor* na seleção e no controle da qualidade dos BLH (Novak *et al.*, 2001). São necessárias mais pesquisas sobre o motivo de descartes do leite por alteração no *flavor* visando reduzir as perdas e otimizar a dinâmica dos BLH (Grazziotin; Grazziotin; Letti, 2010).

### *Sujidades*

As sujidades comumente encontradas no LH são a maior causa de descarte do leite doado e incluem pelos, fios de cabelo, fragmentos de

descamação de pele, alimentos, unhas, insetos, papel, vidro, linha, dentre outros. A avaliação é realizada por analistas capacitados, juntamente com as análises de *flavor* e cor. Caso haja presença de alguma sujidade o leite deve ser descartado, sendo considerado como não conforme (Schiessel *et al.*, 2021).

A qualidade do LH é comprometida quando há presença de sujidades porque está relacionada à ausência de boas práticas durante a ordenha e o armazenamento pela nutriz e que pode levar à contaminação direta e indireta do LH. Este fato reforça a importância da orientação contínua das doadoras, bem como do processo de pasteurização do LH na segurança do alimento ofertado ao neonato (Souza *et al.*, 2023).

### *Cor*

A cor natural do LH varia em função da porção da ordenha, sendo que no início há predomínio da fração hidrossolúvel tendendo a uma cor de “água de coco”, já no período intermediário da ordenha há aumento da concentração de caseína, resultando um tom branco, e no fim da ordenha há aumento dos constituintes lipossolúveis, resultando em um tom mais amarelado. Dessa forma, a cor pode variar desde “água de coco” até amarelo intenso não sendo considerada como não conformidade. Contudo, caso haja presença da coloração rósea, avermelhada ou vermelho-tijolo e marrom, pode caracterizar a presença de sangue, desqualificando o leite para o consumo (BLH-IFF/NT 23.21, 2021c).

### *Conteúdo energético (crematócrito)*

Um dos métodos para o controle de qualidade do LH é o crematócrito, que consiste em um método rápido, por meio do qual se determina a quantidade de creme e se estima a concentração de gordura e o conteúdo energético de uma amostra (BLH-IFF/NT 30.21, 2021d).

A determinação do crematócrito permite selecionar, classificar e direcionar a escolha de um produto que atenda às necessidades nutricionais do receptor, principalmente relacionadas ao ganho de peso e à necessidade de imunobiológicos. O leite é composto por três frações com relação de proporcionalidade entre si. A fração emulsão que constitui os fatores lipossolúveis é inversamente proporcional à fração suspensão, que é constituída por micelas de caseína. Sendo assim, a análise do crematócrito é importante,

pois, quanto maior o teor de gordura do leite, menor o aporte proteico e imunobiológico fornecido ao RN. Por fim, a fração solução é constituída por água e demais constituintes hidrossolúveis dentre eles sais minerais, carboidratos, proteínas do soro e compostos imunobiológicos presentes no leite (BLH-IFF/NT 30.21, 2021d).

#### *Controle microbiológico*

Para o controle microbiológico, os BLH se utilizam de microrganismos indicadores de qualidade sanitária para averiguar a conformidade do leite humano como alimento. Dessa forma, a pesquisa do grupo dos coliformes totais se destaca por ser simples, economicamente viável e segura. A análise é realizada antes e depois do processo de pasteurização do LH, de forma a verificar se as boas práticas foram seguidas no momento da ordenha, armazenamento e transporte do leite e se o processo de pasteurização foi eficaz (Brasil, 2008).

#### 3.4.1 DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ NO LEITE HUMANO

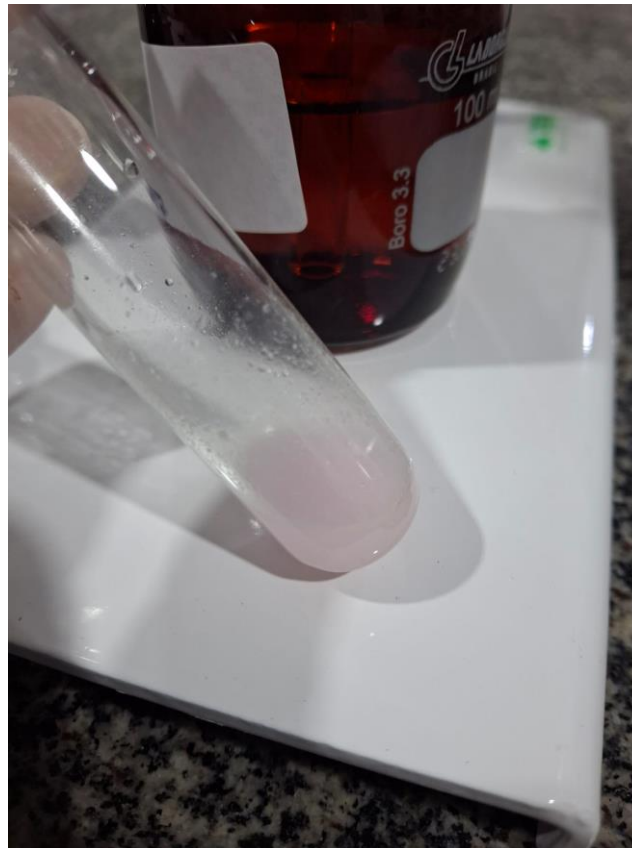
A acidez do leite pode ser classificada como original ou desenvolvida, servindo de indicador sobre a qualidade do alimento, biodisponibilidade de minerais e estabilidade. A acidez original, em torno de 1 a 4 °D, é decorrente da presença dos próprios constituintes do LH. A acidez desenvolvida ocorre a partir do desenvolvimento bacteriano, sendo aceito o limite de até 8 °D pela legislação brasileira (BLH-IFF/NT 29.21, 2021a).

Microrganismos deteriorantes contaminantes no leite fermentam a lactose e a transformam em ácido láctico, elevando a acidez titulável. Essa modificação química desestabiliza proteínas solúveis e as micelas de caseína, e favorece a coagulação do leite. Além disso, leva à redução do valor nutricional e imunológico do LH ordenhado, devido ao consumo dos nutrientes do leite pela microbiota contaminante e pela alteração na absorção de sais minerais pelo receptor, consequência da alteração da osmolaridade (Oliveira; Lopes-Júnior; Sousa, 2022; BLH-IFF/NT 29.21, 2021a; Silva, 2004).

A acidez titulável do LH é determinada por meio de uma solução padrão que contenha um titulante alcalino, o hidróxido de sódio (NaOH). A técnica é

baseada em uma reação entre o titulante alcalino padrão e os constituintes ácidos presentes no LH, até que todos os componentes de caráter ácido da amostra sejam consumidos, o que em leite ocorre em pH 8,3, devido ao efeito tamponante causado pelas proteínas e sais. O ponto final da reação é determinado com o auxílio da solução indicadora – fenolftaleína, à medida que ocorre a mudança de coloração, conforme demonstra a Figura 3 (BLH-IFF/NT 29.21, 2021a).

Figura 3 - Ponto final da reação entre o titulante alcalino padrão e os constituintes ácidos presentes no leite humano



Fonte: A autora (2026)

### 3.5 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA EM LEITE

A determinação de proteínas é de extrema importância para conhecer a composição nutricional do alimento e a adequada destinação aos neonatos, a depender da condição clínica e necessidade nutricional individual. O conteúdo proteico é tradicionalmente avaliado pelo método de *Kjeldahl*, considerado

referência para alimentos e inclusive para análise em leite (Cecchi, 2003; ISO, 2014).

O método de *Kjeldahl*, composto por três etapas (digestão, destilação e titulação), determina o teor de nitrogênio total da amostra, onde fontes não proteicas como ácidos nucleicos, alcalóides, lipídeos nitrogenados, carboidratos nitrogenados e pigmentos nitrogenados, também são aferidas pelo método (Cecchi, 2003). O método de *Kjeldahl* é um dos mais utilizados para a determinação de nitrogênio e conteúdo proteico em alimentos por sua ampla aplicabilidade, seu alto nível de precisão e reprodutibilidade; porém é um método demorado em sua aplicação, apresentando dificuldade de uma digestão rápida sem perda de nitrogênio (Vieira *et al.*, 2016).

Outros métodos analíticos têm sido empregados para a determinação do teor de proteínas no LH, incluindo técnicas clássicas e instrumentais. Destaca-se o método de Dumas, baseado na combustão e determinação do nitrogênio total (Warakaulle *et al.*, 2024). Adicionalmente, são utilizados métodos colorimétricos, como os ensaios com ácido bicinconínico (BCA), de Lowry e de Bradford. Os métodos de BCA e de Lowry envolvem a formação de um complexo cobre-proteína, apresentando elevada sensibilidade e menor variabilidade analítica quando comparados ao ensaio de Bradford. Este último, por sua vez, caracteriza-se pela rapidez, simplicidade de execução e compatibilidade com determinados agentes redutores, diferentemente dos ensaios de BCA e de Lowry (Dent *et al.*, 2024).

Técnicas instrumentais precisas e rápidas são baseadas na espectroscopia no infravermelho médio ou próximo. O analisador de leite humano MIRIS HMA<sup>®</sup> (*Human Milk Analyzer*), utilizado como referência nos Estados Unidos e União Europeia, utiliza radiação de uma fonte de infravermelho que penetra na amostra. A quantidade de radiação absorvida por grupos funcionais específicos de gordura, proteína e carboidrato são avaliadas e a determinação quantitativa é realizada de acordo com a lei de Lambert-Beer – a absorvância é proporcional à concentração. O software processa os dados de medição por meio da calibração interna e os resultados são apresentados ao usuário (Miris AB, 2025). Trata-se de uma técnica rápida, não destrutiva e que requer pequeno volume de amostra. Entretanto, sua aplicação depende de

calibrações frequentes, equipamentos de alto custo de aquisição e manutenção, e condições controladas de operação (De *et al.*, 2019).

Dentre os diferentes métodos de análise de proteínas, destaca-se a possibilidade de identificar as frações proteicas presentes no LH por meio da eletroforese, técnica baseada na migração de moléculas carregadas em um campo elétrico (Sharma *et al.*, 2021). Esse processo permite a separação das proteínas de acordo com seu tamanho e carga elétrica, sendo amplamente utilizado na avaliação do perfil proteico e na identificação de frações como soroproteínas e caseínas (Gandhi *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2021).

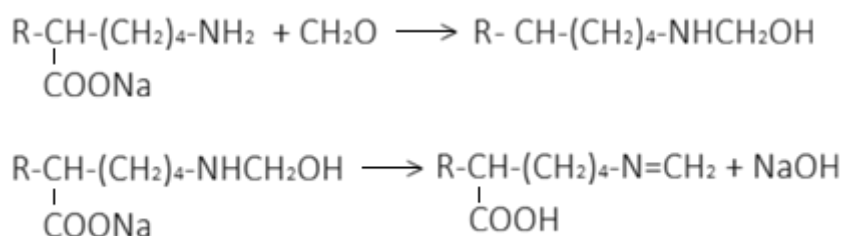
Por sua vez, a cromatografia fundamenta-se na diferença de interação dos compostos entre uma fase móvel e uma fase estacionária, possibilitando a separação de proteínas com base em propriedades como afinidade, em que baseado nessas diferenças, cada componente tem um tempo único e característico para entrar e sair do sistema, podendo ser mais rápido ou mais lento (Coskun, 2016). Dentre elas, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), amplamente empregada na caracterização de componentes do leite pela alta sensibilidade e seletividade permitindo análise simultânea e quantitativa de várias proteínas do leite, inclusive viabilizando a distinção de espécies (Chen *et al.*, 2021). Apesar de sua elevada sensibilidade e precisão, a cromatografia e a eletroforese são mais indicadas para análises laboratoriais detalhadas, tendo sua aplicação rotineira limitada em determinados contextos devido ao alto custo dos equipamentos, maior tempo de execução, uso de reagentes potencialmente perigosos e necessidade de profissionais altamente especializados.

### 3.5.1 MÉTODO DO FORMALDEÍDO OU MÉTODO DE SØRENSEN

O método de Sørensen, baseado na reação com o formaldeído – método do formol, é um método barato, rápido e de fácil execução, além de não utilizar reagentes de complexa manipulação (Oliveira; Segueto; Furtado, 2006). Elaborado por Schiff e aperfeiçoado por Sørensen e sua equipe em 1907, o método é baseado em uma titulação ácido-básica, onde é feita a medição dos prótons liberados pela reação do formaldeído com os grupos amino das cadeias

laterais das proteínas, após prévia neutralização com álcali (NaOH) (Costa Júnior, 2020; Jodidi, 1918).

Conforme Wolfschoon; Vargas (1978), quando o formaldeído reage com os grupos amino das cadeias laterais das proteínas após prévia neutralização com hidróxido de sódio, ocorre em última instância a formação de uma base de Schiff, com reestabelecimento dos grupos carboxílicos, permitindo a posterior neutralização ácido-base, em que a quantidade de base consumida é equivalente à quantidade de grupos amino presentes disponíveis para a reação com o formol, na amostra. As seguintes reações ilustram este mecanismo para a lisina, embora esta não seja o único aminoácido que participa destas reações



Fonte: adaptado de Wolfschoon; Vargas (1978)

Os diferentes reagentes utilizados na técnica desempenham funções específicas e complementares para a adequada determinação do teor de proteína. A solução de formaldeído é o reagente central do método, pois reage com os grupos amino livres das proteínas, formando derivados metilol e promovendo a liberação de íons hidrogênio, o que possibilita a titulação subsequente (Kitamoto e Maeda, 1979). A solução de hidróxido de sódio (NaOH) é utilizada como titulante, neutralizando os íons hidrogênio liberados na reação e permitindo quantificar indiretamente o nitrogênio proteico presente na amostra. O indicador ácido-base utilizado, a fenolftaleína, é empregado para evidenciar o ponto final da titulação, por meio da mudança de coloração na faixa de pH em torno de 8,3 (Costa Júnior, 2020).

O oxalato de potássio é um reagente utilizado na técnica com o intuito de eliminar o efeito de precipitação do fosfato de cálcio coloidal durante a titulação, além de facilitar a detecção do ponto final, por eliminar o esmaecimento da cor rósea formada (Nascimento; Silva, 2024; Silva; *et al.*, 1995). O oxalato de

potássio atua quelando/precipitando o cálcio do leite, principalmente o cálcio ligado aos fosfatos coloidais e solúveis, o que reduz a interferência desses fosfatos na titulação após a reação com o formol, melhora o ponto final e torna a relação entre proteína e volume de titulação mais estável e reproduzível (Pyne, 1932).

Por apresentar uma boa correlação com *Kjeldahl*, o método considerado como referência para esta determinação, o método do formol pode ser aplicado não somente a leite de vaca *in natura*, mas também a diferentes matrizes lácteas, dentre elas o leite de cabra bem como a produtos acabados como o queijo, na determinação de proteólise. Para o uso diverso ao leite de vaca o método apresenta boa correlação desde que realizados os ajustes necessários (Lepilkina; Grigorieva; Guseva, 2024).

### 3.6 PERSPECTIVA DE USO DO MÉTODO DE FORMOL PARA ANÁLISE DE PROTEÍNA EM BANCOS DE LEITE HUMANO

O método do formol possui uma correlação significativa com o método de *Kjeldahl*. Estudos apontam que este método pode ser usado com segurança na quantificação de proteína em leite (Castillo *et al.*, 1962; Lepilkina; Grigorieva; Guseva, 2024; Quirino, 2022). Quirino (2022) adaptou o método do formol (Quadro 1), que se mostrou adequado e de grande relevância para análise de proteína em LH, com rápida execução, simplicidade e aplicabilidade, quando comparado ao método de *Kjeldahl*.

Uma importante alteração do método do formol adaptado para análise de LH consistiu na não utilização de oxalato de potássio, reduzindo o número de etapas e reagentes utilizados na técnica (Quirino, 2022). O oxalato de potássio é utilizado para reduzir o efeito do fosfato, presente majoritariamente nas micelas de caseína, na reação com o formaldeído (Gaucher *et al.*, 2007). No trabalho desenvolvido por Quirino (2022), não houve diferença significativa entre os resultados de proteína em LH obtidos pelo método utilizando oxalato de potássio ou em sua ausência. O LH possui teor de caseína reduzido, em comparação ao leite bovino (Liao *et al.*, 2017; Wood *et al.*, 2021), o que possivelmente levou ao resultado observado.

Quadro 1 - Adaptação do método do formol tradicional para uso em leite humano

Parâmetros do método	Determinação de proteína pelo método do Formol tradicional (Costa Júnior, 2020)	Determinação de proteína pelo método do Formol adaptado para LH (Quirino, 2022)
Quantidade de amostra	10 mL	1 mL
Adição de água destilada	10 mL	Não é adicionada.
Uso do oxalato de potássio 28%	0,4 mL	Não utiliza
Concentração da solução de hidróxido de sódio	0,1 mol/L	0,111 mol/L
Quantidade de fenoltaleína alcoólica 1%	1 mL	1 gota
Quantidade de formol 30-40% P.A. utilizado	2 mL	0,2 mL
Uso de padrão de cor com sulfato de cobalto	sim	não

Fonte: Quirino (2022).

Além disso, houve a necessidade de miniaturização do teste, uma vez que o volume inicial de 10 mL de amostra, empregada no método tradicional, é inviável para os BLH. Foi ajustada a concentração da solução de hidróxido de sódio 0,111 mol/L (Dornic) em titulador automático, realizada a adaptação da quantidade de fenoltaleína alcoólica 1% de 1 mL para 1 gota, e não foi utilizado o padrão de cor com sulfato de cobalto. A quantidade de formol 30-40% P.A. foi reduzida de 2 mL para 0,2 mL, adequando à redução do quantitativo de leite (Quirino, 2022).

As adaptações consideraram o método de análise de acidez em LH, empregado na rotina dos BLH, para viabilizar a realização do método adaptado do formol na determinação de proteína, sem gasto excedente de amostra ou troca de solução alcalina já usada para acidez. A utilização da mesma amostra para a realização de duas análises permitiu melhorar o controle de qualidade do LH, ao mesmo tempo que evitou o consumo adicional para realização de mais análises, não comprometendo o volume disponível para o lactente. Assim, o

método do formol adaptado para LH pode ser facilmente incorporado na rotina dos laboratórios dos BLH sem a necessidade da utilização de equipamentos elaborados para sua execução, visto que consiste na continuidade da análise de acidez Dornic (Quirino, 2022).

Embora os resultados de Quirino (2022) tenham indicado correlação satisfatória entre o método de formol adaptado para LH e o método de *Kjeldahl*, tais evidências não foram suficientes para sustentar a consolidação da técnica em condições de rotina laboratorial nos BLH. O próprio estudo evidenciou a necessidade de uma fórmula global mais consistente para a interpretação dos resultados, bem como da ampliação do número de amostras avaliadas, o que demonstrou a existência de lacunas relevantes quanto à robustez da aplicação do método. Além disso, a análise foi realizada com buretas digitais, e não com o acidímetro Dornic específico para LH, equipamento tradicionalmente empregado nos BLH. Dessa forma, embora a técnica tenha apresentado potencial analítico, permaneceu a necessidade de investigação em condições mais compatíveis com a prática laboratorial real, a fim de fortalecer sua aplicabilidade no contexto e rotina em que se pretende ser aplicado.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi organizado em duas fases. A Fase 1, de determinação da equação de linearidade, consistiu na análise de 196 amostras de LH fornecidas pelo IFF/FIOCRUZ, avaliadas em duplicata, por meio do método do formol adaptado (Quirino, 2022) e do método de *Kjeldahl* (Costa Júnior, 2020, adaptado de IDF 20-1), que foi adotado como método de referência para a determinação do teor proteico.

Na Fase 2, a metodologia foi avaliada nas condições de instrumentação e de vidrarias utilizadas nos BLH. Nessa etapa, buscou-se compará-lo com o método de referência e, ao mesmo tempo, adequá-lo ainda mais à rotina dos bancos de leite humano com o emprego do acidímetro Dornic, específico para a análise de LH, além do conta-gotas com fenolftaleína padrão, fornecido com o equipamento. A adição de formaldeído P.A. foi adaptada para transferência em gotas, em substituição à mensuração de volume definido. As determinações de acidez e de proteína foram realizadas em duplicata, com base em 78 amostras de LH, a fim de avaliar a precisão e a concordância entre a metodologia rápida e o método de referência para determinação de proteína nessas condições.

### 4.2 SELEÇÃO DE AMOSTRAS E LOCALIZAÇÃO

As 274 amostras de LH utilizadas nas duas fases deste estudo foram selecionadas e fornecidas pelo Instituto Fernandes Figueira (IFF), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), localizada no Rio de Janeiro – RJ, e pelo BLH de Juiz de Fora - MG. As amostras congeladas foram transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de Pesquisa da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT), onde foram mantidas abaixo de - 18 °C até o momento das análises.

As amostras utilizadas na primeira fase desta pesquisa foram obtidas a partir de LH doado, não classificado como descarte, dentre os quais 12 eram colostro, 14 leite de transição e 170 leite maduro, em alíquotas de, aproximadamente, 5 mL, acondicionadas em tubos e posteriormente

congeladas. Já na segunda fase, foram utilizadas amostras de LH de descarte sem determinação da fase de lactação, geralmente em maior volume e recebidas do BLH nas mesmas condições e nos frascos originais de coleta, frequentemente apresentando não conformidades como presença de pelos, cabelos, fragmentos de pele, unhas, insetos, papel, vidro e outros materiais estranhos. Embora essas amostras não fossem adequadas para consumo, tais características não comprometeram a execução do estudo, uma vez que não interferiram nos objetivos analíticos propostos. Desta forma, o presente trabalho não prejudicou o suprimento deste alimento para os hospitais credenciados na rede.

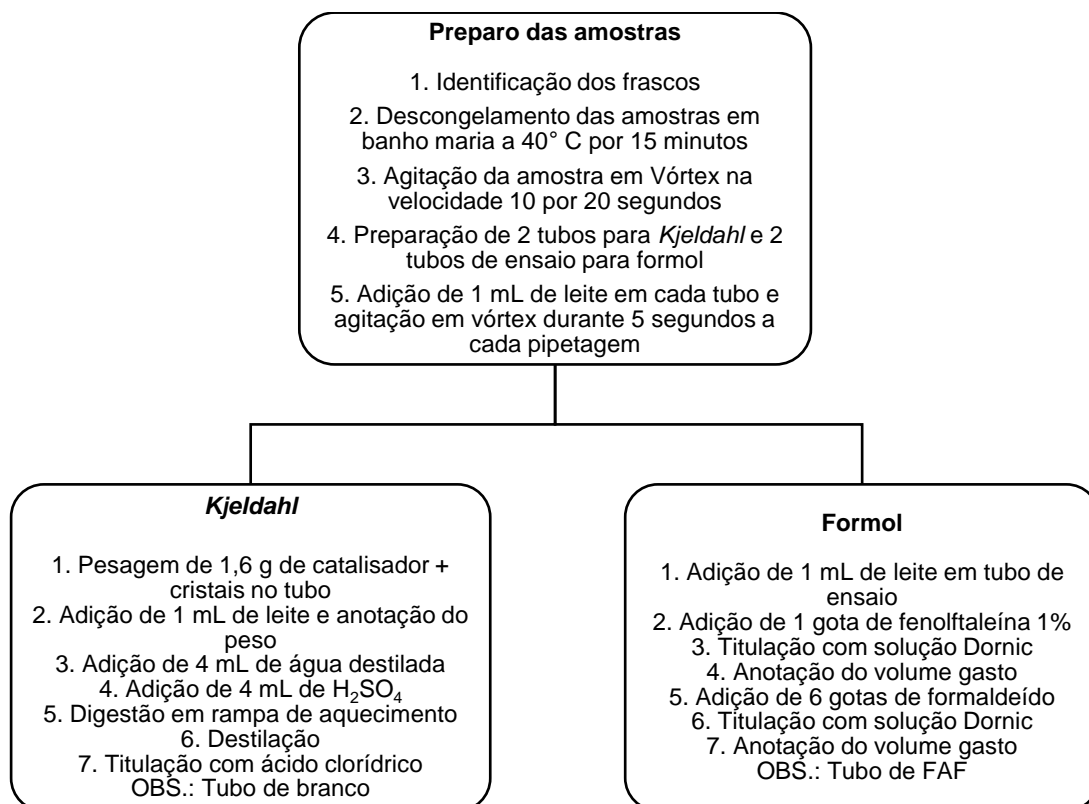
#### 4.3 MÉTODOS DE ANÁLISES

Todas as amostras foram conservadas congeladas até o momento das análises. O processo de descongelamento foi realizado conforme a norma BLH-IFF/NT 24.21. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A técnica consiste em realizar primeiramente a análise de acidez titulável em LH, conforme metodologia descrita na norma BLH-IFF/NT 29.21 e, após a titulação com NaOH 0,111 mol/L (solução Dornic), procede-se a determinação de proteína pelo método do formol modificado conforme Quirino (2022), na mesma amostra em sequência.

Para cada amostra de LH também foi realizada concomitantemente a análise de proteína total pelo método de *Kjeldahl*, conforme descrito por Costa Júnior (2020), adaptado de IDF 20-1. Na Fase 2, os valores obtidos para teor percentual de proteína total pelo método de *Kjeldahl* foram utilizados para a comparação com os resultados obtidos pelo método do formol, valores estes calculados por meio da equação estabelecida na fase 1, permitindo a avaliação da concordância entre os métodos e a validação da técnica proposta quanto à sua aplicabilidade na rotina analítica dos BLH. A Figura 4 apresenta um fluxograma esquemático de preparo de amostras e de análises pelos métodos de *Kjeldahl* e formol adaptado.

Figura 4 - Fluxograma esquemático de preparo de amostras e de análises pelos métodos de Kjeldahl e formol adaptado



Fonte: A autora (2026)

Com relação à quantidade de formaldeído utilizada no estudo, na primeira fase foram pipetados 200 µL de formaldeído P.A. (35 - 40%), em capela de exaustão de gases, para o Erlenmeyer contendo a amostra neutralizada na análise de acidez titulável, utilizando-se pipeta automática.

Na segunda fase, visando a praticidade, a menor manipulação do formaldeído e ao aumento da segurança operacional nos BLH, que em maioria não dispõem de capela de exaustão de gases, foi realizado um estudo de correspondência no qual o volume de 200 µL de formaldeído foi padronizado em número de gotas. Para este estudo, foi utilizado o frasco de vidro âmbar de 20 mL com batoque gotejador 11 mm para frascos com diâmetro nominal (din) 18 mm. Foram realizadas 20 pesagens independentes de alíquotas de 200 µL, 5 gotas e 6 gotas de formaldeído.

#### 4.4 VIDRARIAS, EQUIPAMENTOS E REAGENTES

As vidrarias, acessórios e equipamentos empregados na Fase 1 foram bureta digital, capela de exaustão de gases, Erlenmeyer (capacidade 125 mL), pipetas automáticas calibradas. Na Fase 2 foram utilizadas pipetas volumétricas de vidro, pipetador manual de 3 vias em PVC (tipo “pêra”), tubos de ensaio (em vidro, com tampa de rosca 18 x 150 mm, capacidade 27mL), acidímetro Dornic para LH (graduado em 0,01 mL e dotado de ponteira para microgota) representado pela figura 5 e frasco de vidro âmbar com batoque gotejador para o formol (20 mL, diâmetro 18 mm/2 mm).

Os reagentes empregados foram hidróxido de sódio (NaOH) P.A. (Química Moderna, Santana de Parnaíba/SP), ácido sulfúrico P.A. (Vetec, Duque de Caxias/RJ), ácido clorídrico concentração 0,05 mol/L (Sigma, Barueri/SP) ácido bórico 4% P.A. (CRQ, Casa Grande/SP), solução Dornic (Lablac, Viçosa/MG), formaldeído P.A. (Fmaia, Cotia/SP) e fenolftaleína 1% (EME, Pauliceia/SP).

Figura 5 - Acidímetro empregado para análise de leite humano nos bancos de leite humano



Fonte: A autora (2026)

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na Fase 1, a relação entre o volume de solução Dornic consumido na titulação após reação com formaldeído e o teor de proteína determinado pelo método de *Kjeldahl* foi avaliada por regressão linear, considerando o teor de proteína (%) como variável dependente e o volume de solução Dornic (mL) como variável independente. A significância do modelo foi avaliada por análise de variância (ANOVA) da regressão, adotando-se nível de significância de 5%, e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi calculado para avaliar o ajuste do modelo. Estas análises foram realizadas em software Microsoft Excel® versão 2603.

Na Fase 2, os métodos de determinação de proteína — formol modificado, utilizando a equação obtida na Fase 1, e *Kjeldahl* — foram aplicados em 78 amostras pareadas. Os dados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, que indicou distribuição não normal das diferenças entre as medidas ( $p < 0,05$ ). Diante disso, a comparação entre os métodos foi realizada pelo teste de Wilcoxon, adotando-se nível de significância de 5%. A concordância entre as metodologias foi investigada por meio da análise de Bland-Altman, com o objetivo de identificar viés sistemático e estimar os limites de concordância entre as mensurações. Estas análises estatísticas foram conduzidas no software GraphPad Prism, versão 11.0.0 (84), (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Para verificar a equivalência estatística entre os volumes testados de formaldeído na técnica adaptada à rotina dos BLH e a alíquota padrão de 200  $\mu\text{L}$ , foi aplicado teste t pareado, adotando-se nível de significância de 5%, utilizando o software Microsoft Excel® versão 2603.

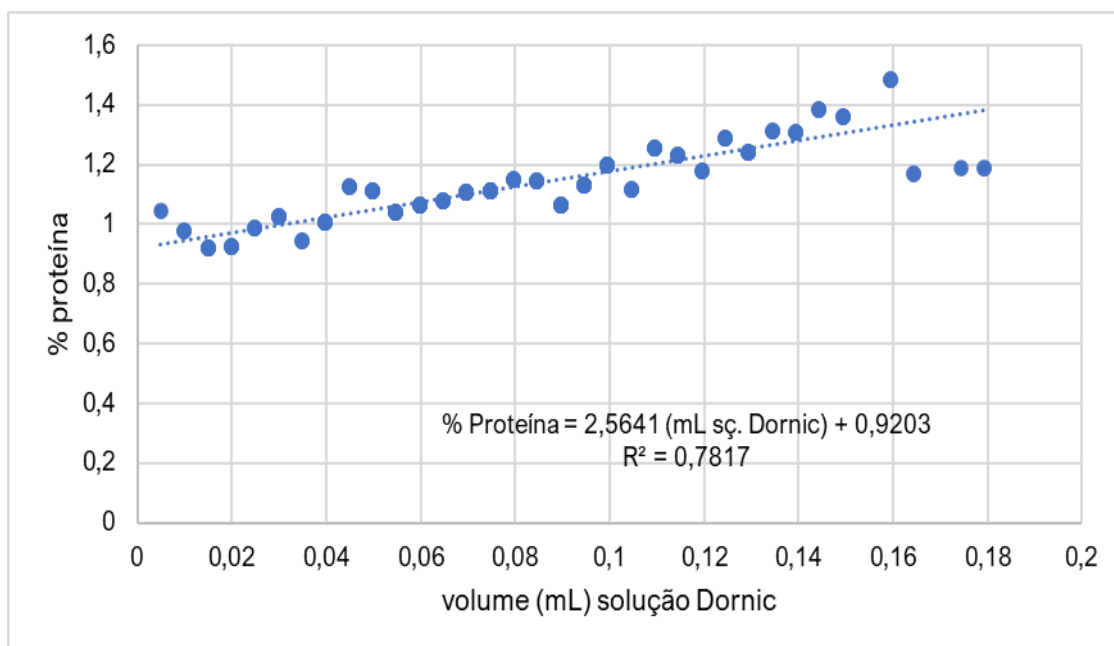
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 FASE 1: DETERMINAÇÃO DA EQUAÇÃO DE LINEARIDADE

A Fase 1 do experimento obteve o resultado preliminar baseado na linearidade e análise de significância da regressão linear obtendo a fórmula demonstrada no Gráfico 1, que possibilita a predição do teor de proteína (%) do LH a partir do volume de solução Dornic (mL) gasto na titulação após reação com o formol.

Embora o número de determinações tenha sido equivalente para ambos os métodos, observou-se menor variabilidade nos valores de volume de NaOH gasto na última titulação pelo método do formol em comparação aos resultados de proteína, resultando na ocorrência de múltiplas determinações de proteína associadas a um mesmo valor de volume. Dessa forma, os dados foram agrupados por níveis da variável independente, sendo utilizada a média dos teores de proteína correspondentes a cada valor de mL como ponto representativo na construção da curva de regressão.

Gráfico 1 - Modelo de regressão linear do teor de proteína (%) em função do volume de solução Dornic (mL) gasto na titulação após reação com o formol em leite humano



Fonte: A autora (2026)

A regressão linear evidenciou relação significativa entre o volume de solução Dornic e o teor de proteína determinado pelo método de *Kjeldahl* ( $p < 0,05$ ), conforme indicado pela ANOVA da regressão. A menor variabilidade observada nos valores de volume titulado, em comparação aos resultados de proteína, resultou na ocorrência de múltiplas respostas associadas a um mesmo nível da variável independente; a utilização das médias por nível de volume permitiu representar adequadamente essa estrutura dos dados, reduzindo a dispersão experimental sem comprometer a tendência da relação entre as variáveis.

Com base nos valores de proteína obtidos pelo método de *Kjeldahl* e nos volumes consumidos de solução Dornic padronizada na titulação pelo método do formol adaptado, os dados foram submetidos a tratamento estatístico, o que resultou no estabelecimento de uma nova equação de correlação que pôde ser usada em leites oriundos de qualquer fase de lactação. Essa equação permitiu obter a estimativa do teor de proteína no LH a partir dos resultados do método do formol adaptado, mediante a aplicação de um fator de conversão aos volumes titulados.

O modelo ajustado é descrito pela equação  $y = 2,5641x + 0,9203$ , em que  $y$  corresponde ao teor de proteína (%) e  $x$  ao volume de solução Dornic (mL). O coeficiente angular positivo indica aumento do teor de proteína com o incremento do volume gasto na titulação, enquanto o intercepto representa o valor estimado de proteína na ausência de consumo de titulante. O coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,7817$ ) indica que aproximadamente 78,17% da variação no teor de proteína é explicada pelo volume de solução Dornic, evidenciando bom ajuste do modelo linear aos dados experimentais.

Pyne (1932) definiu a relação entre volume de solução alcalina gasto na titulação após a reação do formol e teor de proteína em leite bovino, utilizada ainda hoje (Costa Júnior, 2020; Nascimento; Silva, 2024). Este valor não pode ser comparado ao encontrado neste estudo, pois considerava outra concentração de hidróxido de sódio, outra matriz e uso de oxalato de potássio. Porém, Quirino (2022) também encontrou relações entre o método do formol modificado e teor de proteína em LH nas fases colostro, transição e maduro.

## 5.2 FASE 2: DESEMPENHO DO MÉTODO EM CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE BANCOS DE LEITE HUMANO

Para melhor adequação à rotina dos BLH e visando um incremento da segurança na manipulação de reagentes, o volume de formaldeído foi padronizado para utilização em gotas, evitando-se a pipetagem de 200  $\mu$ L. Observou-se diferença significativa entre a quantidade de 200  $\mu$ L e 5 gotas ( $p < 0,05$ ), em contrapartida, não foi observada diferença significativa entre a quantidade de 200  $\mu$ L e 6 gotas ( $p > 0,05$ ), demonstrando equivalência estatística entre essas medidas. Dessa forma, estabeleceu-se que 6 gotas de formaldeído correspondem, de maneira reprodutível, ao volume de 200  $\mu$ L, sendo substituído no método modificado por Quirino (2022).

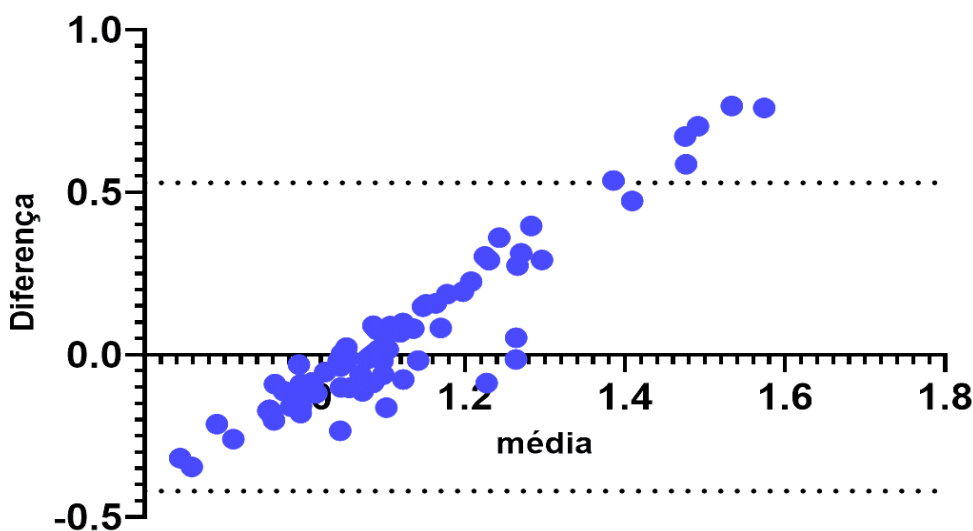
A Tabela 3 demonstra os valores percentuais obtidos para proteína das 78 amostras de LH analisadas pelo método de referência *Kjeldahl* e o método do formol adaptado com a aplicação da fórmula proposta na Fase 1. A comparação entre os métodos, realizada pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas, não evidenciou diferença significativa entre as medições ( $p > 0,05$ ), indicando ausência de deslocamento sistemático relevante entre os resultados. A mediana das diferenças foi de 0,007075, reforçando a proximidade entre as medidas obtidas. Complementarmente, a análise de Bland-Altman mostrou viés médio discreto e positivo ( $p = 0,05448$ ), sugerindo leve tendência de um método apresentar valores superiores ao outro, porém com pequena magnitude, conforme pode ser observado no Gráfico 2. Os limites de concordância de 95% variaram de -0,4200 a 0,5289, demonstrando que as diferenças individuais entre os métodos permaneceram concentradas em uma faixa relativamente estreita. Embora a correlação entre os pares tenha sido estatisticamente significativa ( $r_s = 0,6248$ ;  $p < 0,0001$ ), esse resultado reflete apenas associação entre as medidas, e não substitui a avaliação de concordância. Em conjunto, os resultados sugerem boa proximidade entre os métodos, com ausência de diferença significativa e viés médio reduzido.

Tabela 3 - Valores (%) de proteína pelo método *Kjeldahl* e formol adaptado utilizando a fórmula proposta na regressão linear da Fase 1.

Parâmetros	Método <i>Kjeldahl</i>	Método do formol adaptado
média ± desvio padrão	1,146 ± 0,268	1,092 ± 0,055
mínimo	0,685	0,997
máximo	1,954	1,271
mediana	1,087	1,085

Fonte: A autora (2026)

Gráfico 2 - Teste de Bland-Altman para avaliação da concordância entre os métodos de *kjeldahl* e formol adaptado.



Fonte: A autora (2026)

A interpretação dos resultados deve considerar a finalidade prática da proposta avaliada. Diferentemente dos métodos de referência, que priorizam elevada exatidão analítica, a metodologia adaptada deste estudo está direcionada para a realidade operacional dos BLH, onde a quantificação de proteínas atualmente não faz parte da rotina de seleção BLH-IFF/NT 23.21, 2021c) Limitações relacionadas à infraestrutura, custo, tempo analítico e disponibilidade de técnicas especializadas tornam relevante a busca por alternativas simplificadas (Nascimento; Silva, 2024). Nesse contexto, o desempenho do método não está na reprodução exata dos valores obtidos por técnicas de referência, mas na capacidade de gerar informações comparativas em cenários nos quais a ausência de mensuração inviabiliza a quantificação da

composição proteica. Assim, a estimativa desses valores pode representar um recurso adicional para a rotina dos BLH, especialmente quando o interesse está na identificação de variações, e não exclusivamente na quantificação absoluta (Quirino, 2022).

Além disso, deve-se considerar que o LH é uma matriz biologicamente complexa, cuja composição varia de acordo com estágio da lactação, momento da coleta, condições de armazenamento e características individuais das doadoras (Fernandes; Moreira, 2020). Essa variabilidade pode influenciar o desempenho de métodos simplificados e contribuir para a dispersão dos resultados. Dessa forma, os resultados indicam que o método adaptado apresenta potencial de aplicabilidade sob uma perspectiva operacional, sobretudo na ausência de métodos de referência na rotina (Quirino, 2022).

## 6. CONCLUSÃO

A adaptação do método do formol para LH demonstrou ser uma alternativa viável para a estimativa do teor de proteína total de forma simultânea à determinação da acidez titulável, com potencial real de aplicação na rotina dos BLH. Ao longo deste estudo, foi possível verificar o desempenho de uma proposta metodológica simplificada, baseada na integração com a análise de acidez já realizada nas rotinas diárias, sem necessidade de consumo adicional de amostra e sem exigência de infraestrutura laboratorial complexa. As modificações adotadas tornaram o método mais compatível com a realidade operacional dos BLH, favorecendo sua reprodutibilidade e segurança de execução.

Com base na equação obtida na primeira fase do estudo, na qual se observou relação entre o volume de solução Dornic consumido após a reação com formaldeído e o teor de proteína determinado pelo método de *Kjeldahl*, o método de formol modificado foi aplicado na segunda fase. A comparação entre as duas metodologias não evidenciou diferença significativa, indicando boa proximidade entre as determinações obtidas. A análise de concordância mostrou viés discreto entre os métodos e limites de concordância compatíveis com variação relativamente estreita entre as medidas. Em conjunto, os resultados demonstraram comportamento semelhante entre o método proposto e o método de referência, com associação consistente e sem indícios de discrepância sistemática relevante.

Sob a perspectiva prática, o principal mérito da metodologia estudada é oferecer aos BLH uma possibilidade concreta de ampliar o controle de qualidade nutricional do LH doado utilizando recursos já disponíveis, com execução rápida, baixo custo e sem comprometer o fluxo de trabalho. Em um cenário no qual o teor proteico pode contribuir para decisões mais qualificadas sobre a destinação nutricional do leite, especialmente para recém-nascidos prematuros e imunossuprimidos, a incorporação de uma estimativa acessível representa um avanço importante.

Assim, conclui-se que o método do formol adaptado apresenta aplicabilidade promissora para uso em BLH como estratégia complementar ao controle de qualidade, agregando informação nutricional relevante à triagem do

LH doado. Os resultados deste trabalho demonstram que a proposta cumpre o objetivo de transformar uma limitação da rotina dos BLH em uma possibilidade técnica simples e útil para incrementar o cuidado oferecido aos lactentes mais vulneráveis.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, Marcelle Campos. **Efeito de diferentes técnicas de extração do leite materno de mães de recém-nascidos pré-termo na composição de macronutrientes**. Doctoral Thesis—Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), out. 2023.
- BALDEÓN, Manuel E.; FLORES, Nancy. Aspectos Fisiológicos do Glutamato: O Glutamato no Leite Materno e no Desenvolvimento do Intestino do Lactente. *In: Umami e Glutamato: Aspectos Químicos, Biológicos e Tecnológicos*. [S.l.]: Editora Blucher, 2021. p. 155–178.
- BALLARD, Olivia; MORROW, Ardythe L. Human Milk Composition. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 49–74, fev. 2013.
- BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Presidência da República, 1988
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos**. 1. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 918, de 19 de setembro de 2024**. Brasília, DF: 2024.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE AÇÕES PROGRAMÁTICAS E ESTRATÉGICAS. **Bases para a discussão da Política Nacional de Promoção, Proteção e Apoio ao Aleitamento Materno**. Brasília, DF: 2017.
- BUTTS, Christine A. *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, 4 set. 2018.
- CABRAL, Patricia *et al.* A importância do aleitamento materno nos primeiros meses de vida. **Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro**, v. 2, n. 1, 2023
- CALIL, Valdenise Martins Laurindo Tuma; FALCÃO, Mário Cícero. Composição do leite humano: o alimento ideal. **Revista de Medicina**, v. 82, n. 1–4, p. 1–10, 29 dez. 2003.
- CARRIJO, Danyele Nunes *et al.* The trend of services provided by human milk banks between 2010 and 2019 in Brazil. **Jornal de Pediatria**, v. 98, n. 6, p. 572–578, nov. 2022.
- CASTILLO, L. S. *et al.* Comparison of orange g dye, formol titration, and kjeldahl methods for milk protein determinations. **Journal of Dairy Science**, v. 45, n. 9, p. 1079–1082, set. 1962.

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

CHEN, Y. *et al.* Analysis and comparison of key proteins in Maiwa yak and bovine milk using high-performance liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**. v. 104, n. 8, 2021

COSKUN, Ozlem. Separation Techniques: chromatography. **Northern Clinics of Istanbul**. v. 3, n. 2, 2016

COSTA JÚNIOR, L. C. G. **Métodos físico-químicos para controle de qualidade em leite e produtos lácteos**. 1. ed. Juiz de Fora: e-book, 2020.

DE, Marchi *et al.* Novel applications of infrared technologies in dairy industry. **Advanced Technologies**, v. 8, n. 2, p. 92–98, 2019.

DENT, Terrence; LEMINH, Allison; MALEKY, Farnaz. Comparison of Colorimetric Methods for Measuring the Solubility of Legume Proteins. **Gels**, v. 10, n. 9, p. 551, 25 ago. 2024.

DI MARZO, Larissa; PRANATA, Joice; BARBANO, David M. Measurement of casein in milk by Kjeldahl and sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 7, p. 7448–7456, 1 jul. 2021.

FERNANDES, Daniel Pinheiro; MOREIRA DE SANTANA, Carolina. Leite humano em diferentes estágios de lactação: composição nutricional no município de Cuité. **Revista Interdisciplinar em Saúde**, v. 7, n. Único, p. 1580–1592, 23 ago. 2020.

FONSECA, Rafaela Mara Silva *et al.* O papel do banco de leite humano na promoção da saúde materno infantil: uma revisão sistemática. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, n. 1, p. 309–318, jan. 2021.

GAUCHER, Isabelle *et al.* Physico-chemical characterization of phosphate-added skim milk. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 12, p. 1375–1383, dez. 2007.

GANDHI, Kamal *et al.* Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Advanced Analytical Techniques in Dairy Chemistry. Springer Protocols Handbooks**, p. 103-120, 2022

GRAZZIOTIN, Ana L.; GRAZZIOTIN, Maria C. B.; LETTI, Luiz A. J. Disposal of human milk donated to a human milk bank before and after measures to reduce the amount of milk unsuitable for consumption. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 4, p. 290–294, 11 ago. 2010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **International Standard ISO 8968-1 IDF 20-1 Determination of nitrogen content — Kjeldahl**. 2014.

JODIDI, S. L. Abnormalities in the formol titration method. **Journal of the American Chemical Society**, v. 40, n. 7, p. 1031-1035, 1918. DOI: 10.1021/ja02240a006

KHANNA, Deepti *et al.* Century wide changes in macronutrient levels in indian mothers' milk: a systematic review. **Nutrients**, v. 14, n. 7, p. 1395, 27 mar. 2022.

KITAMOTO, Yasunori; MAEDA, Hiroshi. Reevaluation of the reaction of formaldehyde at low concentration with amino acids. **Journal of biochemistry**, v. 87, p. 1519 – 1530, 1979

LEPILKINA, Olga; GRIGORIEVA, Anastasia; GUSEVA, Alexandra. Protein Determination in Milk: Urgent Issues. **Dairy Industry**, p. 25–31, 17 abr. 2024.

MIRIS. **Miris HMA User Manual**. Uppsala: Miris AB, 2025. PDF (137 p.).

LIAO, Yalin *et al.* Absolute quantification of human milk caseins and the whey/casein ratio during the first year of lactation. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 11, p. 4113–4121, 3 nov. 2017.

MEEK, Joan Younger; NOBLE, Lawrence. Policy Statement: Breastfeeding and the Use of Human Milk. **Pediatrics**, v. 150, n. 1, 1 jul. 2022.

NASCIMENTO, R. R.; SILVA, P. H. F. A importância do método baseado na reação com formol na determinação de proteínas lácteas. **Portal MilkPoint**. 2024. Disponível em: [www.milkpoint.com.br/colunas/ppgctldufjf/metodo-baseado-na-reacao-com-formol-na-determinacao-de-proteinas-lacteeas-236960/](http://www.milkpoint.com.br/colunas/ppgctldufjf/metodo-baseado-na-reacao-com-formol-na-determinacao-de-proteinas-lacteeas-236960/)

NOVAK, Franz R. *et al.* Colostro humano: fonte natural de probióticos? **Jornal de Pediatria**, v. 77, n. 4, ago. 2001.

OLIVEIRA, Claudete de; LOPES-JÚNIOR, Luís Carlos; SOUSA, Cristina Paiva de. Qualidade microbiológica do leite humano pasteurizado de um Banco de Leite Paulista. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 35, 22 fev. 2022.

OLIVEIRA, K. M. G.; SEGHETO, L.; FURTADO, M. A. M. Estudo comparativo entre os métodos do Formol e de Kjeldahl para determinação de proteínas em leite. Juiz de Fora: 2006.

PETERSOHN, Inga *et al.* Maternal diet and human milk composition: an updated systematic review. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, 23 jan. 2024.

PYNE, Gerald Thomas. The determination of milk-proteins by formaldehyde titration. **Biochemical Journal**, v. 26, n. 4, p. 1006-1014, 1932. DOI: 10.1042/bj0261006

QUIRINO, Cintya Emerenciano. **Adaptação do método do formol de quantificação de proteínas para leite humano**. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2022.

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. **BLH-IFF/NT 29.21: Leite Humano Ordenhado – Determinação da Acidez Titulável: Método Dornic.** Rio de Janeiro:2021.

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. **BLH-IFF/NT 26.21: Leite Humano Ordenhado - Verificação de Off-flavor: Método Sensorial.** Rio de Janeiro: 2021

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. **BLH-IFF/NT 23.21: Seleção e Classificação Leite Humano Ordenhado Cru.** Rio de Janeiro: [S.n.].

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. **BLH-IFF/NT 30.21: Leite Humano Ordenhado Determinação Crematócrito.** Rio de Janeiro: [S.n.].

SAMUEL, Tinu Mary *et al.* Nutritional and non-nutritional composition of human milk is modulated by maternal, infant, and methodological factors. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, 16 set. 2020.

SANTOS, A. C. MEIRELES, C. P. A importância da amamentação exclusiva nos seis primeiros meses de vida e o papel da enfermagem. **Revista Coleta Científica**, v. 5, n. 9, p. 58–69, 2021.

SILVA, P. H. F. *et al.* Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação do teor de caseína em leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 50, n. 295, p. 3 – 14, 1995.

SCHENK, Sabrina *et al.* Systemic availability of human milk oligosaccharides in infants and adults: a narrative review. **Advances in Nutrition**, v. 16, n. 9, p. 100488, set. 2025.

SCHIESSEL, Dalton Luiz *et al.* Avaliação do descarte de leite doado à um banco de leite humano. **Revista de Atenção à Saúde**, v. 18, n. 66, p. 05–14, 2021.

SHARMA, Neelima *et al.* Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: Critical analysis and options for better resolution. **International Dairy Journal**, v. 114, n. 3, 2021

SILVA, Denysario Itamyra Soares *et al.* A importância do aleitamento materno na imunidade do recém-nascido. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e664974629, 1 jun. 2020.

SILVA, V. G. **Normas técnicas para banco de leite humano: uma proposta para subsidiar a construção de Boas Práticas.** Doutorado—Rio de Janeiro: Instituto Fernandes Figueira / Fundação Oswaldo Cruz, 2004.

SILVA, Roberta *et al.* Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. **Química nova**, v. 30, n. 9, 2007

SOUZA, Carolina Belomo de *et al.* Promoção, proteção e apoio à amamentação no trabalho e o alcance do desenvolvimento sustentável: uma revisão de escopo. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 28, n. 4, p. 1059–1072, abr. 2023.

URASHIMA, Tadasu *et al.* Recent advances in the science of human milk oligosaccharides. **BBA Advances**, v. 7, p. 100136, 2025.

VIEIRA, A. F. *et al.* Metodologias para determinação de nitrogênio. **Periódico da Unipampa**, 2016.

VIEIRA, Alan A. *et al.* Assessment of the energy content of human milk administered to very low birth weight infants. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 6, p. 490–494, 1 dez. 2004.

WARAKAULLE, Santhoshani *et al.* Advancement of milk protein analysis: From determination of total proteins to their identification and quantification by proteomic approaches. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 126, p. 105854, fev. 2024.

WOLFSCHOON, A.F.; VARGAS, O.L. Reaction mechanism of milk protein determination by formaldehyde titration. **Milchwissenschaft**, v. 33, n. 8, p. 480-482, 1978.

WOOD, Erin L. *et al.* Adjustment of whey:casein ratio from 20:80 to 60:40 in milk formulation affects food intake and brainstem and hypothalamic neuronal activation and gene expression in laboratory mice. **Foods**, v. 10, n. 3, p. 658, 19 mar. 2021.

YI, Dae; KIM, Su. Human Breast Milk Composition and Function in Human Health: From Nutritional Components to Microbiome and MicroRNAs. **Nutrients**, v. 13, n. 9, p. 3094, 2 set. 2021.