

Artigo

Métodos Analíticos Utilizados para a Determinação de Lipídios em Leite Humano: Uma Revisão

Rydlowski, A. A.; Pizzo, J. S.; Manin, L. P.; Zappiello, C. D.; Galuch, M. B.; Santos, O. O.; Visentainer, J. V.*

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (1), 000-000. Data de publicação na Web: 4 de fevereiro de 2020

<http://rvq.sbq.org.br>

Analytical Methods Used for the Determination of Lipids in Human Milk: A Review

Abstract: Human milk is considered the ideal and most complete food for the neonate, due to its balanced nutritional composition, which contributes to the full physical and neurological development of the infant. The lipids present in human milk are sources of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. The polyunsaturated fatty acids of the omega-6 series, such as linoleic acid and omega-3 series, such as α -linolenic acid, are essential and are also precursors of long-chain polyunsaturated fatty acids, such as arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, which are involved in a number of functions, such as the development of the nervous system during childhood and the increase in the intelligence quotient of the infant. Due to the lipid importance of human milk, the aim of this review article was to present the analytical methods that are currently being employed to determine its lipid composition. There are few scientific advances in lipid extraction methods and to date, most studies have evaluated the composition of fatty acids by gas chromatography. Liquid chromatography and mass spectrometry have been widely used to identify and quantify different classes of lipids of human milk.

Keywords: Human milk; lipid composition; identification; quantification; analytical methods.

Resumo

O leite humano é considerado o alimento ideal e mais completo para o neonato, devido à sua composição nutricional equilibrada, contribuindo para o pleno desenvolvimento físico e neurológico do lactente. Os lipídios presentes no leite humano são fontes de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Os ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-6, como o ácido linoleico e da série ômega-3, como o α -linolênico, são essenciais e também são precursores de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, como o ácido araquidônico, ácido eicosapentaenoico e ácido docosahexaenoico, que estão envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso e no aumento do quociente de inteligência do lactente. Devido à importância lipídica do leite humano, o objetivo deste artigo de revisão foi apresentar os métodos analíticos que têm sido atualmente mais empregados para determinar sua composição lipídica. Há poucos avanços científicos quanto aos métodos de extração lipídica e até o presente momento, grande parte dos estudos avaliaram, a composição em ácidos graxos, a partir de cromatografia em fase gasosa. A cromatografia líquida e a espectrometria de massas têm sido utilizadas para identificação e quantificação de distintas classes lipídicas presentes no leite humano.

Palavras-chave: Leite humano; composição lipídica; identificação; quantificação; métodos analíticos.

*Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Química, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

 jesuiv@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20200013](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200013)

Métodos Analíticos Utilizados para a Determinação de Lipídios em Leite Humano: Uma Revisão

Adriela A. Rydlewski,^a Jessica S. Pizzo,^b Luciana P. Manin,^a Caroline D. Zappiello,^b Marília B. Galuch,^b Oscar de O. Santos,^{a,b,c} Jesuí V. Visentainer^{a,b,c,*}

^a Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

^b Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Química, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

^c Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Química, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

*jesuiv@gmail.com

Recebido em 1 de Maio de 2019. Aceito para publicação em 21 de Janeiro de 2020

1. Introdução

2. Delineamento do Estudo

2.1. Critérios de inclusão de referências

2.2. Fontes de informação

3. Lipídios Presentes no Glóbulo de Gordura do Leite Humano

3.1. Seleção da análise de lipídios em leite humano

3.2. Extração e posterior dosagem lipídica do leite humano

3.3. Métodos analíticos instrumentais comumente utilizados para a determinação de lipídios do leite humano

3.4. Métodos cromatográficos

3.5. Cromatografia em Fase Gasosa (GC)

3.6. Cromatografia Líquida (LC)

3.7. Espectrometria de Massas (MS)

4. Conclusões

1. Introdução

O leite humano (LH) é a fonte nutricional mais adequada e completa para os neonatos, além de possuir papel protetor contra doenças infecciosas e otites, principalmente nos primeiros seis meses de vida.^{1,2} Os efeitos protetores do LH estão relacionados com a duração da amamentação, sugerindo um potencial efeito cumulativo, devido

a “programação metabólica” prevenindo contra obesidade, diabetes tipo 2 e leucemia na vida adulta.³⁻⁵ Evidências consistentes indicam que crianças que receberam LH também possuem melhor desempenho em testes de inteligência e maior nível de escolaridade, quando comparados a lactentes que não foram amamentados.^{6,7}

Até o 7º dia após o parto, o LH é considerado colostro, entre o 8º e 14º dia pós-parto é considerado leite de transição e após o 15º dia

pós-parto passa a ser considerado leite maduro.⁸ O LH é composto por mais de 150 componentes diferentes como água, vitaminas, minerais, substâncias imunocompetentes, hormônios, fatores tróficos ou moduladores de crescimento, além de carboidratos, proteínas e lipídios.³

Os lipídios são um amplo e complexo grupo de compostos solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água, podendo ser divididos em distintas classes lipídicas com base em suas estruturas químicas.⁹ Dentre os principais lipídios do LH encontram-se os triacilgliceróis (TAGs), diacilgliceróis (DAGs) e monoacilgliceróis (MAGs).¹⁰ Os TAGs representam majoritariamente a composição lipídica do LH, variando de 97,6 % no colostro a 99 % no leite maduro, sendo a principal fonte de energia do neonato e também de ácidos graxos (AGs) poli-insaturados, monoinsaturados e saturados.^{1,10}

Demais componentes lipídicos como fosfolipídios e colesterol estão presentes em menores proporções fazendo parte do glóbulo de gordura do LH, representando no máximo 2 % do total lipídico, apesar de possuírem funções importantes.¹¹ Os fosfolipídios desempenham papel anti-inflamatório na resposta imune dos neonatos. Também estão envolvidos na sinalização neuronal e parecem atenuar os efeitos das doenças relacionadas à idade, sendo que suas concentrações são mais elevadas no colostro (1,10 %) do que no leite de transição e maduro (0,80 % e 0,60 %, respectivamente).¹² Dentre os fosfolipídios do LH, a esfingomielina é presente exclusivamente na membrana do glóbulo

de gordura e é capaz de modular a atividade da lipase intestinal, contribuindo positivamente no desenvolvimento da microbiota intestinal infantil.¹³ O colesterol também é um dos componentes das membranas celulares, e seu conteúdo no LH é considerado alto quando comparado ao leite de vaca, com teores variando de 10 a 20 mg/dL, sendo mais elevado no colostro humano, quando comparado ao leite maduro.^{10,11,14} A elevada ingestão de colesterol pelo neonato tem sido sugerida como um fator benéfico, principalmente nos primeiros dias de vida, por estar envolvido na síntese de mielina presente nos neurônios, contribuindo para o desenvolvimento do sistema nervoso central e por possuir importante papel no metabolismo de ácidos biliares e esteroides.¹¹⁻¹⁵

A distribuição das diferentes classes de lipídios presentes no leite humano e suas principais funções é apresentada na Figura 1.

A determinação de lipídios em LH requer o emprego de métodos que considerem as variações desses compostos, já que tais variações podem influenciar os resultados.¹⁶ Portanto, é necessário conhecer as características dos compostos de interesse (analitos) contidos no LH (matriz) a fim de se escolher o método ideal a ser empregado. Além disso, para a adequada aplicação de cada método, geralmente, é necessário que a matriz seja submetida a um processo de extração e/ou concentração, para que seja possível a obtenção e detecção dos analitos através do método empregado.^{17,18}

Análises químicas de uma amostra engloba a aplicação de métodos analíticos, qualitativos ou

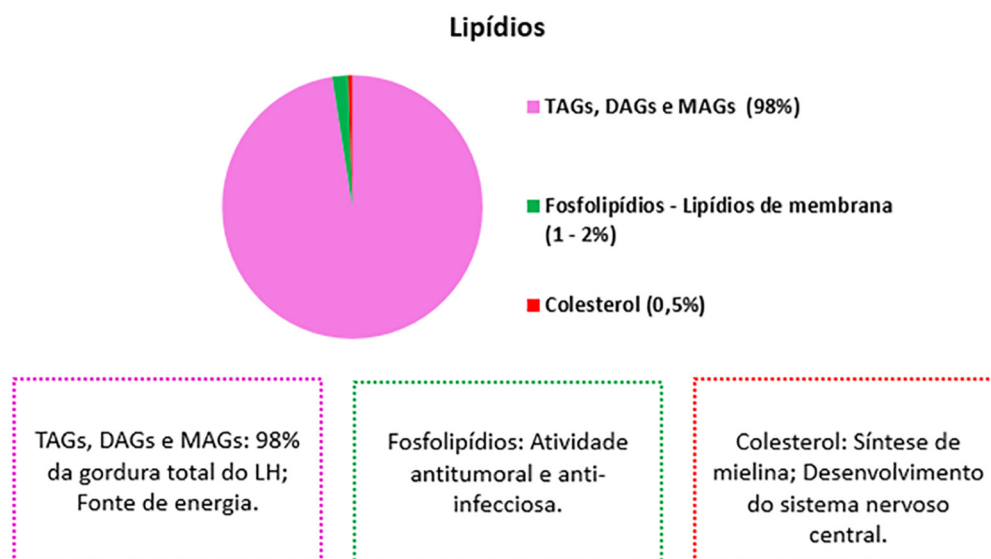


Figura 1. Distribuição das diferentes classes de lipídios do leite humano e suas principais funções

quantitativos, a fim de se identificar e de quantificar, respectivamente, seus constituintes.^{9,19} Tais métodos analíticos têm-se destacado nos últimos anos, devido aos seus avanços tecnológicos e por contribuírem para a determinação de uma ampla gama de substâncias lipídicas.²⁰

Devido à importância lipídica do LH para o desenvolvimento do neonato, sua completa constituição tem sido continuamente estudada. Para tal finalidade, distintos métodos analíticos têm sido aplicados e aprimorados ao longo dos anos, envolvendo técnicas analíticas avançadas, tais como a cromatografia em fase gasosa (gas chromatography - GC), a cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) e a espectrometria de massas (Mass Spectrometry - MS).²¹⁻²³ Portanto, o objetivo deste trabalho é apresentar uma revisão bibliográfica sobre os principais métodos analíticos descritos na literatura, atualmente utilizados para a realização da determinação de diversas classes de lipídios do LH.

2. Delineamento do Estudo

O delineamento do estudo baseou-se em uma revisão bibliográfica com delineamento experimental, realizada em base de dados eletrônicos, buscando-se artigos científicos sobre o tema. Os idiomas utilizados na pesquisa foram o português e o inglês, sendo os termos delimitados em: 1 – Leite Humano; 2 - Composição Lipídica do Leite Humano; 3 - Ácidos Graxos no Leite Humano; 4 - Lipídios do Leite Humano; 5 - Métodos; 6 - Métodos Analíticos; 7 - Determinação Lipídica.

2.1. Critérios de inclusão de referências

Foram incluídos estudos relevantes sobre métodos analíticos utilizados na extração e determinação de lipídios do LH.

2.2. Fontes de informação

A pesquisa foi realizada envolvendo livros da área de química, química analítica e artigos científicos indexados nas bases de dados eletrônicas PubMed (*US National Library of Medicine*), *Scientific Electronic Library Online Brasil* (SciELO), *Web of Science* e Portal Capes.

Foram selecionados 81 artigos que abordavam sobre o tema do presente artigo.

3. Lipídios Presentes no Glóbulo de Gordura do Leite Humano

O LH possui composição única em lipídios que compõe o glóbulo de gordura e alguns dos benefícios destes compostos foram expostos na introdução. Estes lipídios apresentam-se na forma de glóbulos emulsificados na fase aquosa do leite, podendo ser de diferentes tamanhos, possuindo um núcleo formado por lipídios apolares constituídos principalmente por TAGs, DAGs, MAGs e AGs livres.²⁴ Após a secreção do retículo endoplasmático das células epiteliais mamárias no citosol, o núcleo do glóbulo de gordura é coberto por uma membrana que consiste de uma monocamada de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol.²⁵ Quando essas gotículas lipídicas são excretadas das células epiteliais mamárias para o espaço alveolar, elas são envoltas por uma camada da membrana plasmática apical, resultando na adição de uma bicamada de lipídios anfipáticos, constituída principalmente de fosfatidilcolina, esfingomiélin e colesterol, bem como cerebrosídeos e peptídeos bioativos.^{12,14} Esta membrana externa atua como um estabilizante da emulsão lipídica,¹⁴ conforme apresentado na Figura 2.

A composição dos TAGs no LH é de aproximadamente 28 % de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), 31 % de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e 41 % de ácidos graxos saturados (AGS).¹ Os TAGs possuem um esqueleto de glicerol de três carbonos numerados como sn-1, sn-2 e sn-3, aos quais três AGs são ligados a ele.⁹ O modelo de uma molécula de TAG está apresentado na Figura 3.

A Figura 4 apresenta a distribuição dos principais AGs encontrados no LH. Dentre eles, os AGPIs da série ômega-6, como o ácido linoleico (AL, 18:2n-6) e da série ômega-3, como o α -linolênico (ALA, 18:3n-3), são essenciais, ou seja, não podem ser produzidos pelo metabolismo humano e, portanto, necessitam ser adquiridos a partir da alimentação. Estes AGPIs apresentam importantes funções, como a formação de prostaglandinas e leucotrienos, que possuem importantes funções de crescimento e manutenção da pele, do sistema imunológico

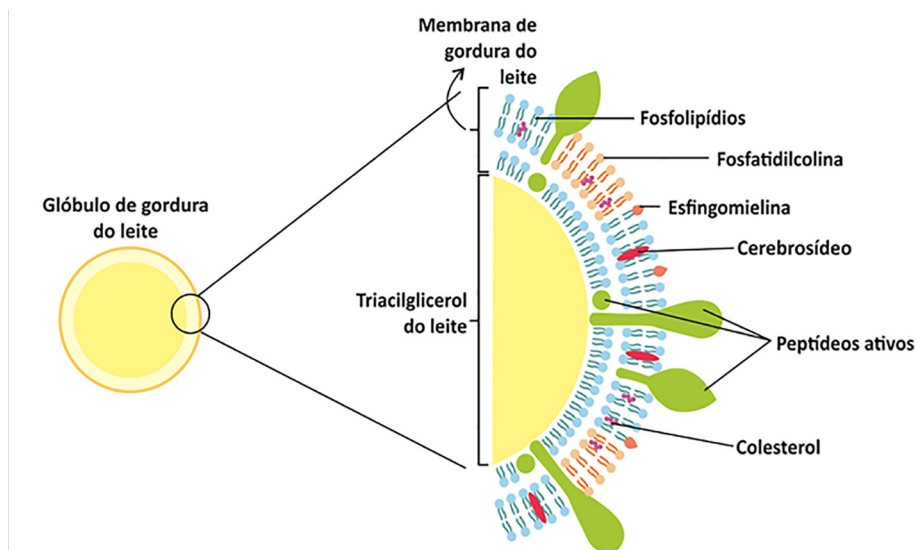


Figura 2. Representação esquemática do glóbulo de gordura do leite humano

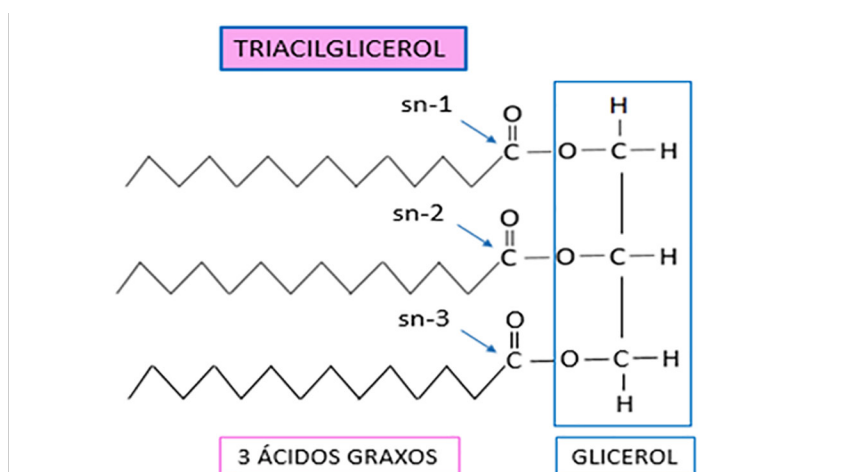


Figura 3. Molécula de triacilglicerol (TAG)

e central. Também são precursores de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL), como o ácido araquidônico (AA, 20:4n-6), o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3).^{1,27} Todos estes AGPI-CL, principalmente o DHA, estão relacionados a maturação neuronal, sinaptogênese e expansão da substância cinzenta do cérebro, durante o último trimestre da gestação e intensamente até o segundo ano de vida. Portanto, a dieta da gestante deve conter 300 mg/dia de DHA para atender as necessidades metabólicas fetais e 200 mg/dia no período de lactação, para transferir para o LH um teor de 0,3 % do total de AG, pois o neonato não possui capacidade totalmente desenvolvida para converter os AGPI em AGPI-CLs, devido a imaturidade fisiológica.^{6,14,25,28}

A gestação e os primeiros dois anos de vida, conhecidos como os 1000 dias, são críticos para o crescimento da criança e, por esta razão, é tão importante que o neonato receba estes AGPI-CL em quantidades adequadas para seu pleno desenvolvimento.²⁹

O ácido oleico (AO, 18:1n-9) é o AG predominante dentre os ácidos graxos monoinsaturados (AGMIs) do LH, sendo considerado um AG marcador do leite maduro, utilizado pelo neonato principalmente como fonte energética, além de favorecer a absorção de gordura pelo intestino delgado e a mielinização dos axônios.^{22,10,25,30}

Dentre os ácidos graxos saturados (AGSs) do LH, o ácido palmítico (AP, 16:0) é o majoritário. Este AG apresenta efeitos analgésicos por elevar

os níveis de anandamida, neurotransmissor responsável pela ligação endógena que ocorre em receptores canabinóides do cérebro, podendo produzir sedação.³¹

Dos três AGs ligados ao glicerol nos TAGs do LH, mais de 50 % do AP está localizado na posição sn-2, enquanto as posições sn-1 e sn-3 são ocupadas por AO e AL, o que facilita o processo de hidrólise destes últimos AGs pela lipase pancreática, sendo AP absorvido junto com os sais biliares. Já no leite de vaca e nas fórmulas infantis, o AP está nas posições sn-1 e sn-3, que ao ser hidrolisado no intestino, forma um complexo com cálcio e magnésio, dificultando a absorção destes minerais e de gordura.^{14,27,32}

3.1. Seleção da análise de lipídios em leite humano

Antes de serem realizadas as análises químicas, devem-se conhecer as características dos diferentes lipídios presentes no LH que se pretende identificar e/ou quantificar, para posteriormente, serem selecionados os métodos analíticos adequados.^{14,18}

Devido à grande variedade e característica hidrofóbica dos lipídios, há certa dificuldade de se realizar análise lipídica abrangente.³³ Desta forma, como os lipídios apresentam-se na forma de glóbulos de gordura emulsificados na fase aquosa do leite, para a devida aplicação de cada técnica

analítica, é necessário que a amostra de leite passe por processo de extração, que é uma etapa essencial para se obter a máxima quantidade lipídica que esteja presente na amostra.¹⁴ Além disso, é importante que os lipídios de interesse estejam concentrados de uma maneira que sejam detectáveis pela técnica escolhida, de forma a garantir a exatidão e a reprodutibilidade dos resultados.³⁴⁻³⁶

3.2. Extração e posterior dosagem lipídica do leite humano

A extração dos lipídios presentes no LH para posterior determinação do seu teor total ou análise de sua constituição é uma etapa importante no procedimento analítico e, portanto, deve ser realizada com acurácia. Isto porque fatores como a co-extração de substâncias não-lipídicas e a oxidação indesejada podem afetar a exatidão dos resultados futuramente obtidos.³⁶

Tratando-se da dosagem do teor total de lipídios, a extração lipídica pode ser realizada através de extração líquido-líquido, em que utiliza-se solventes que sejam capazes de solubilizar todos os compostos lipídicos, para que o resultado encontrado seja o mais correto possível. Quando estes solventes são adicionados ao LH, há a formação de duas fases, uma aquosa e outra orgânica. Os lipídios ficam dissolvidos na fase orgânica, que é a fase inferior, enquanto os

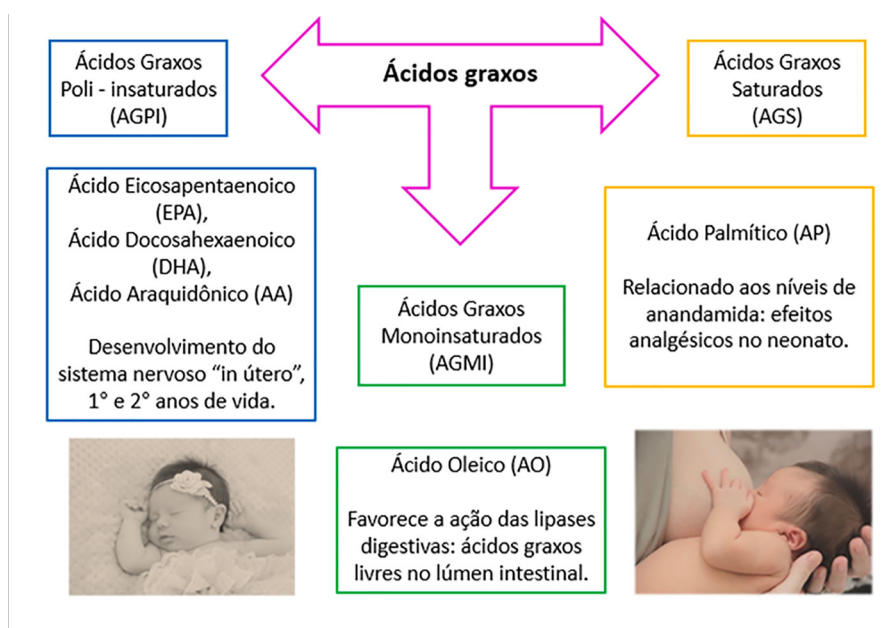


Figura 4. Esquema de alguns importantes ácidos graxos presentes no leite humano e suas respectivas funções

carboidratos, sais e a água ficam solubilizados na fase aquosa, superior. Desta forma, é possível coletar os lipídios extraídos de maneira eficaz e dosá-los utilizando métodos gravimétricos.^{37,38} Nestes métodos, é realizada a evaporação total do solvente e a dosagem lipídica é quantificada pela diferença do peso da vidraria vazia ao se iniciar a análise e vidraria com a fase lipídica, após a extração lipídica.³⁹

Dentre as metodologias amplamente empregadas para a extração lipídica, destaca-se o procedimento proposto por Soxhlet (1879), que utiliza a extração a quente com o refluxo de solvente puro, que pode ser éter de petróleo, éter dietílico ou n-hexano. Porém, este método deve ser evitado para a extração lipídica de LH, pois contribui para que ocorra processos de peroxidação e hidrólise lipídica. A ocorrência destas reações pode comprometer a identificação e a quantificação posterior de lipídios sensíveis ao calor, como os AGs de cadeia curta.^{34,40}

O método mais amplamente empregado para extração de lipídios em LH é o proposto por Folch *et al.* (1957), no qual é utilizada uma mistura de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v). Os autores desenvolveram este método a partir de tecidos animais, que tornou-se aplicável a qualquer escala desejada, com mínimas perdas de lipídios, além de produzir um extrato que pode ser seco sem formação de espuma e sem divisão de proteolipídios.⁴¹

Bligh e Dyer (1959) desenvolveram um procedimento baseado em Folch, utilizando menores proporções dos solventes extratores (clorofórmio, metanol e água) e ambos os métodos são realizados sem o uso de aquecimento.^{41,42} Uma vantagem apresentada pelo uso do clorofórmio e do metanol é a capacidade destes solventes extraírem tanto os lipídios neutros como os lipídios polares, obtendo-se resultados mais eficientes, quando comparados ao método proposto por Soxhlet.³⁴ Tanto no método de Soxhlet, quanto nos métodos de Folch e Bligh-Dyer, o teor total de lipídios é quantificado gravimetricamente.³⁹

Lucas *et al.* (1978), desenvolveram o método denominado Crematócrito, que separa a porção de creme por centrifugação de uma amostra de LH. Esta porção lipídica, ou “creme”, é rotineiramente utilizada para a realização do cálculo do percentual de gordura de amostras de leite em Bancos de Leite Humano brasileiros, a partir da utilização de

uma fórmula específica.⁴³ Rydlewski *et al.* (2019) estimaram o conteúdo de gordura em *pools* de leite colostro, leite de transição e leite maduro através do método Crematócrito e os resultados obtidos foram comparados com o método de extração de Folch. Os resultados do conteúdo de lipídios totais apresentaram diferenças significativas entre os mesmos *pools*, em todas as fases do LH avaliados por ambos os métodos, confirmando a maior eficiência de extração lipídica pelo método Folch.⁴⁴

Outros métodos de extração, baseados em Folch *et al.* (1957) e em Bligh e Dyer (1959), foram desenvolvidos posteriormente, com o intuito de substituir e reduzir o volume dos solventes tóxicos, como o clorofórmio, além de aumentar o rendimento da extração e otimizar o tempo de análise.^{45,46} Uma destas técnicas utiliza o éter metil-terc-butilílico, baseando-se também na separação de fases e tem sido utilizada para a análise de lipídios contidos no LH.²²

A extração em fase sólida (SPE) também pode ser utilizada na extração de diferentes classes de lipídios, utilizando-se cartuchos contendo uma fase sólida para a extração dos lipídios, que são posteriormente eluídos com solventes orgânicos adequados, enquanto os interferentes permanecem retidos na fase sólida, promovendo a separação das fases de interesse.^{36,47,48} Kallio *et al.* (2017) utilizaram a SPE para isolar TAGs e Pérez-Cejuela *et al.* (2018) para extrair fosfolipídios, utilizando cartuchos à base de sílica gel e os resultados de ambos os trabalhos mostraram-se eficientes para tais objetivos.^{36,37}

Já Garwolińska *et al.* (2017) empregaram a técnica de micro-extração em fase sólida (SPME) para a extração de lipídios, com o objetivo de identificar glicerofosfolipídios, glicerolipídios e esfingolipídios. Os autores concluíram que este método demonstrou ser rápido e simples, além de permitir a extração de uma ampla faixa de lipídios de LH, sem o uso de solventes tóxicos, como o clorofórmio.⁴⁹

3.3. Instrumentos analíticos instrumentais comumente utilizados para a determinação de lipídios do leite humano

A escolha da técnica analítica deve levar em consideração aspectos técnico-científicos e econômicos, como por exemplo, o analito de interesse presente no LH e suas características

físico-químicas (solubilidade, pKa, estado físico - sólido, líquido ou gasoso), tempo de análise, resposta analítica satisfatória e custo por análise.²⁰ Além disso, devido à complexidade, uma análise completa de todos os lipídios presentes na amostra de LH requer mais de um instrumento e, portanto, a escolha deste instrumento depende dos objetivos do estudo.^{22,50}

A GC é bastante utilizada para a determinação da composição em AG, e com o avanço da tecnologia, outras técnicas como a LC e a MS também passaram a ser utilizadas na realização da análise de outras classes lipídicas do LH.^{50,51}

3.4 Métodos cromatográficos

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes presentes em uma amostra, realizada através da distribuição dos constituintes entre duas fases que estão em contato, a fase móvel e a fase estacionária.⁵² A fase estacionária pode ser sólida, líquida, ou quimicamente ligada, enquanto a fase móvel pode ser líquida, gasosa ou um fluido supercrítico. Quando a fase estacionária for mais polar do que a fase móvel a cromatografia é dita em fase normal, e quando a fase estacionária for mais apolar que a fase móvel, é classificada como fase reversa.¹⁷ Os métodos cromatográficos comumente utilizados para a realização de análise lipídica em LH são a GC e a LC; destacando-se sistemas de HPLC e de UHPLC (cromatografia líquida de ultra eficiência).²³ As principais características destas técnicas cromatográficas estão apresentadas na Tabela 1.

3.5 Cromatografia em Fase Gasosa (GC)

A determinação da composição em AGs de LH é comumente realizada por GC, porém, antes da análise cromatográfica, uma etapa envolvendo a derivatização lipídica é empregada a fim de tornar voláteis os compostos de interesse. Todavia, tal processo pode eliminar muitas informações estruturais sobre espécies lipídicas como glicerofosfolipídios, esfingolipídios, TAGs, DAGs, MAGs e ésteres de colesterol, não sendo eficiente para a identificação destas moléculas lipídicas.⁵²

Em GC, o gás de arraste utilizado tem a função de arrastar o analito através da coluna cromatográfica.¹⁸ As colunas capilares de cianopropil variando de 30 a 60 m de comprimento são bastante empregadas em análises de AGs de LH por ser uma fase estacionária polar, proporcionando maior seletividade e poder de resolução na separação dos isômeros.^{47,51}

O GC acoplado ao detector por ionização em chama (Flame Ionization Detector - FID) é o método de separação e determinação mais utilizado por ser mais barato, além dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs ou FAMEs - fatty acid methyl esters) poderem ser facilmente identificados e detectados, sendo o FID robusto, barato (quando comparado a outros detectores) e de fácil manutenção.⁵² A identificação dos EMAGs é feita baseando-se na ordem de eluição e no tempo de retenção destes analitos e comparando-os com padrões.²³ De acordo com Simionato *et al.* (2010) quando a determinação de AG é realizada utilizando-se padrão interno, há maior confiabilidade na interpretação

Tabela 1. Características das técnicas cromatográficas (GC, HPLC e UHPLC)

Técnica cromatográfica	Tipo de uso	Características da coluna	Matrizes analíticas	Tempo de análise
Cromatografia em fase gasosa (GC)	Separação e identificação de compostos orgânicos voláteis, facilmente volatilizáveis ou termicamente estáveis	Diâmetro interno: 0,1 – 5 mm; comprimento: 5 a 100 m	Sólidas, líquidas e gasosas	Moderado
Cromatografia líquida alta eficiência (HPLC)	Separação e identificação de compostos orgânicos, inorgânicos, biológicos, moleculares e iônicos	Diâmetro interno: 3,0-4,6 mm; FE: partículas com 3-10 µm; pressão de 100 Mpa	Líquidas	Rápido
Cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)	Separação e identificação de compostos orgânicos, inorgânicos, biológicos, moleculares e iônicos	Diâmetro interno: 1,0-2,1 mm; FE: partículas menores do que 2 µm; pressão de 134 Mpa	Líquidas	Muito rápido

Fonte: o autor, 2020.

dos resultados obtidos por este método.⁵³ A determinação de AG também pode ser realizada por métodos de normalização, expressos como porcentagem de peso de AG, em relação a todos os AGs encontrados no cromatograma.⁵⁴ A GC-FID possui a desvantagem de ser restrita a amostras voláteis e termicamente estáveis. Para analitos não voláteis, uma etapa prévia de derivatização é necessária, a fim de transformá-los em compostos voláteis. Além disso, esta análise pode degradar lipídios sensíveis a altas temperaturas, que consequentemente não serão identificados.⁵⁵

O FID é o detector mais sensível para hidrocarbonetos, sendo adequado para a detecção de AG, que são ácidos carboxílicos com longas cadeias de hidrocarbonetos. Os EMAGs respondem diferencialmente no FID, isto porque a combustão de compostos de carbono produz íons e, esta resposta depende do tamanho de cadeia e da presença de grupos funcionais substituídos por AG em um hidrocarboneto, que reduz sua eficiência de combustão. Assim, é necessário utilizar fatores de correção para os EMAGs, em relação ao padrão interno.⁵⁴ De acordo com Visentainer 2012, para se determinar a composição em AG por GC-FID de forma eficiente, é necessário utilizar os fatores de resposta usando o número de carbono efetivo e conversão de EMAGs para ácido graxo. Estes fatores são o experimental (fator de correção empírico - FCE) e o fator de correção teórico (FCT).⁵⁶

Manin *et al.* (2019) compararam as composições em AG do leite colostro, leite de transição e leite maduro pasteurizados e liofilizados por um período de seis meses, a partir da análise em GC-FID, utilizando uma coluna capilar CP-7420 e um injetor split/splitless. A temperatura do detector foi de 250 °C e do injetor 230 °C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio (H₂), o gás make-up foi o nitrogênio (N₂), e os gases da chama foram o H₂ e ar sintético. O forno do GC-FID foi programado para 65 °C por 4 minutos, depois aquecido a 185 °C a 15 °C por minuto e mantidos nesta temperatura durante 12 minutos. Em seguida, a temperatura foi elevada para 235 °C por 20 minutos e mantida durante 14 minutos. Neste trabalho foram identificados 25 AGs em todas as diferentes fases de LH, que não apresentaram diferenças significativas na qualidade lipídica entre os diferentes métodos de conservação, dentro dos tempos avaliados.⁵⁷

Sokol *et al.* (2015) utilizaram a GC-FID para comparar o perfil de AGs em amostras de LH, leite

de vaca e da fórmula infantil Lacprodan®PL-20. A coluna utilizada na GC-FID foi a capilar de 60 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno. O hélio (He) foi utilizado como gás de arraste e a temperatura do injetor e do detector foram de 250 e 260 °C, respectivamente. Os autores observaram que o LH e o Lacprodan apresentaram perfil semelhante em AGs, com níveis mais elevados de AGs insaturados, quando comparados ao leite de vaca.⁵¹

Em um estudo realizado Saphier *et al.* (2013) foi determinada a composição em AGs do LH de mulheres israelenses por GC-FID, com o objetivo de compará-los com substitutos de leite para o neonato. Os AGs foram separados em uma coluna capilar de sílica fundida RTX-2330 (40 m de comprimento por 0,18 mm de diâmetro interno), com fase estacionária constituída por biscianopropil cianopropilfenil polisiloxano. A temperatura do injetor e do detector foram de 250 °C e 270 °C, respectivamente e o He foi utilizado como gás de arraste. Os resultados mostraram que cerca de 31 % dos AGs totais encontrados no LH foram o ácido oleico, 21 %, ácido palmítico e 20 %, ácido linoleico; o total de AGs representou 42 % do total de AGs. Já o conteúdo de AGMI foi de 33 %. Também foi observado que a composição dos AG mais abundantes presentes nos substitutos do leite, são semelhantes aos encontrados no LH.⁵⁸

Gardner *et al.* (2017) investigaram se as proporções de AGs no LH mudam em resposta a infecções da mãe e do neonato, através da análise de GC-FID, utilizando-se uma coluna capilar de 0,32 mm de diâmetro interno, revestida com BPX-70. A temperatura do injetor foi de 250 °C e do detector de 300 °C. O gás de arraste utilizado foi o He. No total, foram identificados quinze AGs, sendo que as proporções de ácido cáprico e láurico foram significativamente menores, e o do ácido palmítico foi maior quando as mães estavam doentes, em comparação com amostras de mães saudáveis. As proporções do ácido esteárico foram maiores quando a criança estava doente, mas não foram relacionadas à saúde materna.⁵⁹

Jiang *et al.* (2016) investigaram a composição em AGs em LH de colostro, leite de transição e leite maduro em lactantes de três regiões da China e a relação com a ingestão de alimentos por estas lactantes durante o período de lactação, por GC-FID. Neste trabalho foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (60 m comprimento e 0,25 mm diâmetro interno),

o gás de arraste utilizado foi o nitrogênio e as temperaturas tanto para injeção quanto para detecção foi de 270 °C. Os resultados mostraram que a composição em AG do leite variou com o período de lactação e com as regiões geográficas da China. Os AGs cáprico e láurico aumentaram ao longo do período de lactação. Já os AGMI aumentaram significativamente do colostro (34,50 %), para o leite de transição (37,06 %), enquanto que os AGPI foram encontrados em maiores concentrações no colostro (29,58 %). O conteúdo destes AGs apresentaram diferença significativa entre as regiões da China, sendo que a diferença de hábitos alimentares foi um fator influenciador destes resultados.⁴⁷

Barreiro *et al.* (2018) utilizaram a GC equipada com o FID como detector e uma coluna capilar DB-Was (60 m de comprimento e 0,25 µm de diâmetro interno) para comparar o perfil de AGs em LH com fórmulas infantis. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste e a temperatura do injetor e do detector foram de 260 °C. Os autores também confirmaram que os níveis de AGs nas fórmulas são inferiores aos níveis encontrados no LH, com exceção das fórmulas fortificadas. Além disso, os resultados obtidos demonstraram que, após 1 ano de lactação, o LH ainda é boa fonte de AGs essenciais e de AGPI para o neonato.⁵⁵

No estudo realizado por Chuang *et al.* (2013) foram comparadas as concentrações de AGs livres presentes no LH de mães taiwanesas de neonatos prematuros e nascidos a termo, com fórmulas infantis. Neste estudo, a GC foi acoplada ao MS. Os resultados mostraram que os níveis de AGs livres no LH das mães taiwanesas estão de acordo com os resultados para diferentes populações geograficamente distintas. No entanto, o conteúdo de AGs livres nas formulações infantis se mostraram inferiores aos encontrados no LH.⁶⁰ O maior teor de AGs livres no LH é extremamente favorável ao neonato, que os utiliza como fonte de energia direta, já que a imaturidade enzimática nestes neonatos é um fator presente.⁸

Villaseñor *et al.* (2014) utilizaram a GC-MS para caracterizar AGs utilizando uma coluna 122-5332G DB5 (30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno). A fase estacionária consistiu em 95 % de dimetil e 5 % de difenil polissiloxano. O gás de arraste utilizado foi o He. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C. Os resultados mostraram que as concentrações dos ácidos oleico, palmitoleico e linoleico aumentaram nas

amostras coletadas na quarta semana, quando comparados com aquelas coletadas nos primeiros sete dias após o parto.²²

Apesar da GC ser amplamente utilizada para determinação de AGs, Beggio *et al.* (2018) desenvolveram e validaram um método para quantificar o teor de colesterol em amostras de LH com o uso da GC-FID. Eles observaram que o teor de colesterol, durante as fases de lactação, diminuiu ligeiramente ao longo do tempo de 13,1 mg/100 g no 1º mês para 11,3 mg/100 g 120 dias após o parto.⁶¹

3.5.1. Derivatização lipídica para a análise da composição em ácidos graxos

Após a extração dos lipídios das amostras de LH, a composição em AGs é comumente determinada por GC, empregando-se como preparo de amostra a hidrólise dos TAGs seguida de derivatização (transformação lipídica) dos AGs livres resultantes, formando-se uma mistura de EMAGs ou de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAGs ou FAEEs - fatty acid ethyl esters), quando metanol e etanol são utilizados, respectivamente. Os EMAGs ou EEAGs são voláteis, portanto, estão na forma adequada para serem identificados e quantificados através da GC. Para lipídios que não são voláteis ou facilmente volatilizáveis, a HPLC pode ser aplicada.^{21,24}

Um procedimento de derivatização que pode ser empregado em análises de AGs em LH é o da esterificação e transesterificação utilizando a catálise ácida com os reagentes trifluoreto de boro (BF₃) em metanol, ácido clorídrico (HCl) em metanol ou ácido sulfúrico (H₂SO₄).^{45,59} O BF₃, em metanol, é um reagente muito reativo devido a sua alta eletropolaridade.⁶¹ Porém, o BF₃ é extremamente tóxico, apresenta custo elevado e possui um tempo de vida útil limitado.⁴⁵ O HCl é de baixo custo e facilmente disponível, porém algumas classes lipídicas, como os TAGs, não se solubilizam no reagente HCl em metanol sendo necessário o acréscimo de um outro solvente, como o clorofórmio.⁵⁹ Já o H₂SO₄, quando utilizado em excesso, não deve ser empregado para a metilação de AGPI devido ao poder oxidante do H₂SO₄, porém, este reagente também é de baixo custo e possui a vantagem de ser menos tóxico do que o BF₃.⁶³

Através da metodologia de esterificação e transesterificação utilizando catálise ácida e básica

descrita por Hartman e Lago (1973), é possível se obter os EMAGs utilizando-se aproximadamente 50 mg de amostra de lipídios, que são diluídos em solução de hidróxido de sódio (NaOH) e metanol. Como reagente esterificante utiliza-se uma mistura preparada a partir de cloreto de amônio, ácido sulfúrico e metanol. A desvantagem deste método é que se utiliza aquecimento a 100 °C, por 10 minutos, durante a realização do procedimento completo.⁶⁴ Elevadas temperaturas podem degradar os AGs de cadeia curta, como os ácidos butírico (4:0), capríco (6:0), caprílico (8:0) e cáprico (10:0) presentes na amostra de LH, que consequentemente, não serão identificados por métodos subsequentes de determinação de AGs. A temperatura elevada é o principal fator que influencia na geração de produtos de degradação, e também favorece a conversão a derivados metoxilados em posições alílicas.⁶⁵

Na metodologia padronizada ISO 2002, em que se utiliza hidróxido de potássio (KOH) como catalisador básico, há a vantagem da reação ser realizada a frio, além de ser simples, rápida e passível de ser aplicada em lipídios em LH, já que este possui conteúdo pequeno de AGs livres.⁶⁶ Por outro lado, na utilização de catalisadores básicos há a possibilidade de não ocorrer a completa metilação dos AGs presentes no LH, o que pode levar a erros de quantificação.⁵³

3.6 Cromatografia Líquida (LC)

A LC é uma técnica de separação, na qual a fase móvel empregada é líquida enquanto que a fase estacionária pode ser sólida ou líquida. Como fase móvel, pode ser empregado um solvente ou uma mistura de solventes, por exemplo, metanol, acetonitrila e água. Fases estacionárias sólidas são materiais adsorventes, como a sílica, enquanto que fases estacionárias líquidas podem estar depositadas sobre um suporte sólido ou quimicamente ligadas a este.^{9,17} A separação lipídica em LH é mais frequentemente realizada empregando-se coluna com fase estacionária C18, mas outras fases estacionárias, como a C8, também podem ser utilizadas na separação de todas as classes de lipídios e fosfolipídios, respectivamente.^{7,18}

Na HPLC, utilizam-se fases estacionárias de partículas muito pequenas, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel, e há inúmeras colunas

cromatográficas disponíveis no mercado.²³ O solvente a ser utilizado como fase móvel deve ser compatível com o detector utilizado, não deve decompor ou dissolver a fase estacionária, deve ser de alto grau de pureza e ter polaridade adequada para permitir a separação dos componentes da amostra.⁵²

A UHPLC é um avanço da técnica de HPLC, utilizando os mesmos princípios que a HPLC, porém, com mais vantagens. As fases estacionárias possuem partículas menores que 2 µm, e devido à sua instrumentação (bombas, injetores e detectores) pode operar em pressões muito altas, além de se utilizar menores volumes de amostra. Estas características, juntamente com a alta velocidade da fase móvel, aumenta a resolução e a capacidade de detecção da técnica, além de diminuir o tempo de análise.⁶⁷ Devido à grande variedade de lipídios no LH, várias fases estacionárias e combinações de solventes são empregadas na HPLC e na UHPLC, dependendo do tipo de lipídio de interesse.²³

A LC de fase reversa possibilita a separação de lipídios intactos e de AGs livres baseados na polaridade, no grau de saturação e no comprimento da cadeia, enquanto que a LC em fase normal pode ser empregada para separar lipídios, tais como glicerofosfolipídios, pela sua classe.⁶⁸

A HPLC em fase reversa tem sido amplamente utilizada para a separação e identificação de TAGs, porque fornece uma boa resolução destas moléculas. Desta forma, estes compostos são separados de acordo com o comprimento da cadeia e com o grau de insaturação dos AGs.⁵⁹ Neste tipo de análise, geralmente tem sido utilizado um gradiente binário de acetonitrila e isopropanol ou um gradiente ternário de acetonitrila, diclorometano e acetona. No entanto, este último gradiente pode levar a baixa resolução dos picos de TAGs.⁴⁶

Garwolińska *et al.* (2018) utilizaram HPLC acoplada a MS (HPLC-MS) para a caracterização de glicerofosfolipídios, glicerolipídios, esfingolipídios e esteróis, e mostraram que o método utilizado é rápido, livre de solventes tóxicos e adequado para a análise qualitativa da composição lipídica de amostras de LH.¹⁵

A HPLC-MS é uma técnica que pode ser utilizada para a caracterização e quantificação de fosfolipídios do LH, podendo estes serem separados por uma coluna C18 em classes como fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina,

fosfatidilserina, fosfatidilcolina e esfingomielina.¹³ Tavazzi *et al.* (2018) utilizaram HPLC-MS/MS em fase normal para quantificar estas classes mais abundantes de fosfolípidios em LH, demonstrando que este equipamento possui alta sensibilidade capaz de detectar compostos de baixo peso molecular.⁵⁰ Villaseñor *et al.* (2014) utilizaram a LC-MS e para a separação dos componentes de interesse foi utilizada uma coluna de fase reversa C8. Dentre os lípidios identificados neste trabalho, foram encontrados glicerofosfolípidios, esfingolipídios, TAGs, MAGs, DAGs e ésteres de colesterol.²²

3.7 Espectrometria de Massas (MS)

A MS é comumente associada a métodos cromatográficos, podendo fornecer resultados quantitativos e qualitativos dos lípidios do LH, sendo bastante eficiente para a análise de glicerofosfolípidios, esfingolipídios, TAGs, DAGs, MAGs e ésteres de colesterol. A adição de padrões internos apropriados é necessária para a análise lipídica quantitativa destas classes lipídicas. A MS é utilizada para identificar compostos ionizados, baseando-se na sua razão massa e carga (m/z).²³ O espectrômetro de massas possui maior sensibilidade e especificidade quando comparado a outros sistemas de detecção, não sendo necessária a derivatização da amostra lipídica do LH para a realização da análise de identificação de possíveis TAGs.⁵² Além disso, neste método, utiliza-se pouco volume de amostra e o tempo de análise leva de 5 a 10 minutos, por replicata.⁵¹

Após a realização da análise, os dados são exibidos como espectros de massas e são processados para desotipagem, seguido de identificação e quantificação de espécies lipídicas individuais, por métodos de processamento de dados ou *software* exclusivo para as técnicas analíticas utilizadas. É fundamental corrigir os efeitos dos aglomerados isotópicos do pico de ânions sobre a intensidade do seu pico monoisotópico para desotipagem espectral de massa, a menos que padrão(s) interno(s) seja(m) utilizado(s), além de curva de calibração para espécies individuais, no caso de análises realizadas em LC-MS. Os dados qualitativos e quantitativos de lípidios devem ser processados utilizando-se dados de bioinformática.^{69,70}

Algumas fontes de ionização são mais

frequentemente usadas na MS para análise lipídica. Dentre elas, a ionização por electrospray (Electrospray Ionization -ESI) é uma técnica de ionização na qual os íons são produzidos através da aplicação de uma alta voltagem, que produz um campo elétrico na superfície de um tubo capilar através do qual passa a solução líquida da amostra. Este forte campo elétrico dispersa a solução da amostra em um jato fino de gotículas carregadas, formando os íons, auxiliados pelo fluxo de nitrogênio.^{71,72}

A ESI-MS operando em modo positivo tem sido aplicada para se obter informação estrutural de moléculas polares como TAGs, fosfolípidios e glicolipídios.⁷³ Kallio *et al.* (2017) utilizaram a MS e MS/MS para análise de TAGs com ionização por electrospray, no modo positivo. A eluição de seis pares de TAGs regioisômeros, representando diferentes combinações de AGs, ocorreu de acordo com seus números de carbono equivalentes (NCE) (LLLn/LLnL NCE = 40; OOC/OCO ECN = 42; OOL/OLO, NCE = 46; PPM/PMP NCE = 46; OOP/OPO, NCE = 48 e OOS/OSO NCE = 50), onde C representa ácido cáprico, L: ácido linoleico, Ln: ácido alfa-linolênico, M: ácido mirístico, O: ácido oleico, P: ácido palmítico e S: ácido esteárico. Além disso, os pares de TAGs regioisoméricos das mesmas combinações de AGs tiveram retenção idêntica e não se separaram um do outro.³⁷

A infusão direta por ESI-MS é uma técnica rápida, precisa e simples que pode ser utilizada para a análise lipídica de possíveis TAGs do LH.^{74,75} Apesar destas vantagens, há a possibilidade de ocorrerem alguns problemas associados à técnica, como por exemplo: supressão de íons, interferência isotópica e diferenciação de isômeros. Estes problemas podem dificultar a identificação exata da massa do lípido de interesse.⁷⁶

Rydlewski *et al.* (2019) avaliaram o perfil lipídico de *pools* de colostro, leite de transição e leite maduro, em que os lípidios foram obtidos por diferentes métodos de extração lipídica. Foi utilizado um espectrômetro de massas triplo quadrupolo, com uma fonte ESI. Os *pools* de LH foram introduzidos no sistema por infusão direta, operando em modo positivo (ESI (+)). Neste trabalho, os autores utilizaram apenas 50 mg de lípido, que foram diluídos em clorofórmio. Na sequência, 5 μ L desta solução foi diluída em 1 mL de metanol/clorofórmio 9:1. Posteriormente, foram adicionados 20 μ L de formiato de amônio às amostras para formar

adutos e, favorecer a ionização via $[TAG + NH_4]^+$, visando a reprodutibilidade do perfil lipídico. Além disso, foi possível identificar a provável composição dos TAGs presentes nas diferentes amostras analisadas, utilizando-se simulação computacional a partir de base de dados.⁴⁴

Sokol *et al.* (2015) utilizaram a MS/MS para identificar lipídios em amostras de LH, leite de vaca e de Lacprodan® PL-20. Os autores também adicionaram formiato de amônio às amostras. Neste trabalho, foi possível identificar 136 moléculas de lipídios de 6 diferentes classes, dentre elas TAGs, fosfolipídios e esfingomielina. O método demonstrou que o LH e o leite de vaca são semelhantes ao nível de classes lipídicas, enquanto que o Lacprodan é, conforme indicado pelo fabricante, enriquecido em fosfolipídios. A análise por MS/MS proporcionou a detecção de íons fragmentados correspondentes a perda neutra de AGs de cadeia curta (isto é, AGs com 4 a 10 átomos de carbono), que não poderiam ser identificados pelo método de GC. Esta análise também revelou que as moléculas de TAG do LH são compostas por AGs de cadeia mais longa e insaturada, em comparação ao leite de vaca e ao Lacprodan, que são compostos por uma maior proporção de moléculas de TAG constituídos por AGs saturados e de cadeia curta.⁵¹

Outras técnicas de ionização também são citadas na literatura e podem ser utilizadas para realização de análise lipídica, como a ionização e dessorção a laser assistida por matriz - MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) e a ionização química à pressão atmosférica - APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization).⁷⁰

A MALDI permite a análise de moléculas grandes ou lábeis, podendo ser utilizada para determinação de quase todas as classes de lipídios. Essa técnica envolve a incorporação de analitos em uma matriz que absorve energia no comprimento de onda do laser (infravermelho ou ultravioleta). O laser pulsado irradia os analitos, desencadeando a dessorção, para facilitar a ionização das moléculas do analito, que serão analisadas e, posteriormente, detectadas.⁷⁰ Em nossa busca de dados, não encontramos trabalhos que utilizassem esta técnica de ionização para análise de lipídios em LH. Apesar disso, Garcia *et al.* 2012 utilizaram a MALDI-MS com o intuito de revelar adulteração do perfil lipídico de leite de vaca em pó, a partir da adição de 10 % de óleos vegetais (soja, palma e dendê) ou gorduras

animais (sebo de vaca e banha de porco) e os resultados obtidos pelos autores foram bastante satisfatórios.⁷⁷

A APCI é outra técnica de ionização que utiliza reações de moléculas de íons em fase gasosa à pressão atmosférica. A ionização ocorre ao longo de um eletrodo, onde as afinidades relativas de prótons dos íons de gás reagente e as moléculas de analito gasoso permitem a transferência ou a formação de prótons para produzir os íons moleculares. Esta técnica é aplicável a compostos apolares ou de média polaridade, voláteis e termicamente estáveis.⁷⁸ Na APCI são formados íons pseudo-moleculares intactos, $[M+H]^+$ no modo positivo ou $[M-H]^-$ no modo negativo, porque a energia empregada nesta fonte de ionização não é suficiente para gerar fragmentação significativa das moléculas do analito.⁷⁹

Em 2001, Mottram e Evershed realizaram análises com leite de vaca e identificaram 120 espécies de TAG usando HPLC-APCI-MS.⁸⁰ Gastaldi *et al.* (2011) utilizaram HPLC-APCI MS/MS para avaliar a composição de TAGs de leite de vaca e LH revelando que o leite de vaca maduro possui mais de 40 % de TAGs com número total de carbonos menor que 40. Estes achados se devem à presença de AGs de cadeia curta e estes resultados contribuíram para que fosse possível distinguir o leite de vaca do LH, em posteriores estudos de autenticação.⁸¹

4. Conclusões

Até o presente momento, ocorreram poucos avanços tecnológicos quanto ao desenvolvimento de métodos de extração lipídica, já que a maioria dos trabalhos ainda utiliza os métodos antigos, que requerem grandes volumes de solventes tóxicos. Os métodos analíticos disponíveis têm sido capazes de auxiliar na maior compreensão das características dos lipídios do LH. Os métodos cromatográficos (GC, HPLC e UHPLC) e a ESI-MS são atualmente, os métodos mais empregados para a identificação, caracterização e quantificação de diferentes classes lipídicas. Dentre os métodos cromatográficos, a GC-FID pode ser considerada como método consagrado na determinação de AGs, por apresentar precisão satisfatória, além da possibilidade da utilização de diversos tipos de colunas disponíveis. Além disso,

os resultados obtidos por este método podem ser de fácil reprodutibilidade, graças à utilização dos fatores de correção empírico e teórico, que proporcionam confiabilidade e permitem comparação entre resultados de diferentes estudos. Os avanços tecnológicos desenvolvidos até o presente momento são capazes de proporcionar uma amplitude no conhecimento de características lipídicas do LH, principalmente na área de espectrometria de massas. Ressalta-se que avanços científicos contínuos são de grande relevância para a área, com o intuito de aprimorar cada vez mais os métodos analíticos em relação ao tempo de análise, custos e qualidade tecnológica, proporcionando, principalmente, a evolução do conhecimento sobre as características das espécies lipídicas, nutrientes tão importantes na saúde do lactente.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao laboratório APLE-A (Analítica Aplicada a Lipídios, Esteróis e Antioxidantes) pelo apoio; à CAPES, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro e bolsas de estudo.

Referências Bibliográficas

- ¹ Koletzko, B.; Rodriguez-Palmero, M.; Demmelmair, H.; Fidler, N.; Jensen, R.; Sauerwald, T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development* **2001**, *65*, S3. [PubMed]
- ² Bowatte, G.; Tham, R.; Allen, K.J.; Tan, D.J.; Lau, M.; Dai, X.; Lodge, C.J. Breastfeeding and childhood acute otitis media: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatrica* **2015**, *104*, 85. [CrossRef] [PubMed]
- ³ BRASIL. Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar. **2015**. [Link]
- ⁴ Horta, B.L.; de Mola, C.L.; Victora, C.G. Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure, and type-2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatrica* **2015**, *104*, 30. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵ Amitay, E.L.; Keinan-Boker, L. Breastfeeding and childhood leukemia incidence: a meta-analysis and systematic review. *JAMA Pediatrics* **2015**, *169*:e151025. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Horrocks, L.A.; Yeo, Y.K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological Research* **1999**, *40*, 211. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷ Victora, C.G.; Bahl, R.; Barros, A.J.D.; França, G.V.A.; Horton, S.; Krasevec, J.; Murch, S.; Sankar, M.; Walker, N.; Rollins, N.C. Breastfeeding In the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* **2016**, *387*, 475. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Ballard, O.; Morrow, A. L.; Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America* **2013**, *60*, 49. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ Damodaran, S.; Parkin, K.L.; Fennema, O.R. *Química De Alimentos De Fennema*. 4a ed, Artmed:Porto Alegre, 2000.
- ¹⁰ Jensen, R. G. Lipids in human milk. *Lipids* **1999**, *34*, 1243. [PubMed]
- ¹¹ Kalembe, D.; Dąbrowska, M. Chemistry of Lipids. In: Budryn, G.; Żyżelewicz, D. (Eds). *Plant Lipids Science, Technology, Nutritional Value and Benefits to Human Health*. Research Signpost: Kerala, 2015.
- ¹² Giuffrida, F.; Cruz-Hernandez, C.; Flück, B.; Tavazzi, I.; Thakkar, S. K.; Destailats, F.; Braun, M. Quantification of phospholipids classes in human milk. *Lipids* **2013**, *48*, 1051. [CrossRef] [Link]
- ¹³ Nejrup, R. G.; Licht, T. R.; Hellgren, L. I. Fatty acid composition and phospholipid types used in infant formulas modifies the establishment of human gut bacteria in germ-free mice. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 3975. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Koletzko, B. Human milk lipids. *Annals of Nutrition and Metabolism* **2016**, *69*, 28. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Garwolińska, D.; Namieśnik, J.; Kot-Wasik, A.; Hewelt-Belka, W. Chemistry of human breast milk – a comprehensive review of the composition and role of milk metabolites in child development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66*, 11881. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Du, J.; Gay, M. C. L.; Lai, C. T.; Trengove, R. D.; Hartmann, P. E.; Geddes, D. T. Comparison of gravimetric, creatinocrit and esterified fatty acid methods for determination of total fat content in human milk. *Food Chemistry* **2017**, *217*, 505. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁷ Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S.; *Fundamentos De Cromatografia*. Unicamp: Campinas, 2006.

- ¹⁸ Moldoveanu, S.; David, V.; *Modern sample preparation for chromatography*. 1a. ed., Elsevier: Amsterdam, 2014.
- ¹⁹ Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; *Fundamentos De Química Analítica*. Cengage Learning: São Paulo, 2010.
- ²⁰ Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*. 7a. ed. Boston, Ma: Cengage Learning, 2016.
- ²¹ Simas, R.C.; Catharino, R. R.; Cunha, I. B.; Cabral, E. C.; Barrera-Arellano, D.; Eberlin, M. N.; Alberici, R. M. instantaneous characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *The Analyst* **2010**, 135, 738. [PubMed]
- ²² Villaseñor, A.; Garcia-Perez, I.; Garcia, A.; Posma, J. M.; Fernández-López, M.; Nicholas, A. J.; Modi, N.; Holmes, E.; Barbas, C. Breast milk metabolome characterization in a single-phase extraction, multiplatform analytical approach. *Analytical Chemistry* **2014**, 86, 8245. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Hu, T.; Zhang, J. L. Mass-spectrometry-based lipidomics. *Journal of Separation Science* **2018**, 41, 351. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴ Raczky, M.; Rudzińska, M. Analysis of plant lipids. In: Grażyna Budryn. Dorota Żyżelewicz (Eds). *Plant Lipids Science, Technology, Nutritional Value And Benefits To Human Health*. 1th ed. Research Signpost, 2015.
- ²⁵ Costa, A. G. V.; Sabarense, C. M. Modulation and composition of fatty acids in human milk. *Revista de Nutrição* **2010**, 23, 445. [CrossRef]
- ²⁶ European Society of Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. Agostoni, C.; Braegger, C.; Decsi, T.; Kolacek, S.; Mihatsch, W.; Moreno, L.A.; Puntis, J.; Shamir, R.; Szajewska, H.; Turck, D.; van Goudoever, J. Supplementation of N-3 LCPUFA to the diet of children older than 2 years: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **2011**, 53, 2. [Link]
- ²⁷ Silva, R. C.; Escobedo, J. P.; Gioielli, L. A. composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. *Química Nova* **2007**, 30, 1535. [Link]
- ²⁸ Gaete, M. G.; Atalah, E. S. Niveles de LC-PUFA n-3 en la leche materna después de incentivar el consumo de alimentos marinos. *Revista Chilena de Pediatría* **2003**, 74, 158. [CrossRef]
- ²⁹ Zalewski, B. M.; Patro, B.; Veldhorst, M.; Kouwenhoven, S.; Crespo Escobar, P.; Calvo Lerma, J.; Koletzko, B.; Van Goudoever, J. B.; Szajewska, H. Nutrition of infants and young children (one to three years) and its effect on later health: A systematic review of current recommendations (EarlyNutrition project). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2015**, 57, 489. [CrossRef]
- ³⁰ Mehrotra, V.; Sehgal, S. K.; Bangale, N. R. Fat structure and composition in human milk and infant formulas: Implications in infant health. *Clinical Epidemiology and Global Health* **2018** [CrossRef]
- ³¹ Mayo, L. M.; Asratian, A.; Lindé, J.; Morena, M.; Haataja, R.; Hammar, V.; Augier, G.; Hill, M. N.; Heilig, M. Elevated anandamide, enhanced recall of fear extinction, and attenuated stress responses following inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH): a randomized, controlled experimental medicine trial. *Biological Psychiatry* **2019**. [CrossRef]
- ³² Silva, R. C. D.; Gioielli, L. A. Lipídios estruturados: alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano. *Química Nova* **2009**, 32, 1253. [Link]
- ³³ Sud, M.; Fahy, E.; Cotter, D.; Brown, A.; Dennis, E. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H. Jr; Murphy, R. C.; Raetz, C. R.; Russell, D.W.; Subramaniam, S. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research* **2007**, 35, D527. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁴ Brum, A. A. S.; Arruda, L. F.; Regitano-D'Arce, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova* **2009**, 32, 849. [Link]
- ³⁵ Lagarda, M. J.; García-Llatas, G.; Farré, R. Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, 41, 1486. [CrossRef]
- ³⁶ Pérez-Cejuela, H. M.; Ten-Doménech, I.; El Haskouri, J.; Amorós, P.; Simó-Alfonso, E. F.; Herrero-Martínez, J. M. Solid-phase extraction of phospholipids using mesoporous silica nanoparticles: application to human milk samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2018**, 410, 4847. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁷ Kallio, H.; Nylund, M.; Boström, P.; Yang, B. Triacylglycerol regioisomers in human milk resolved with an algorithmic novel electrospray ionization tandem mass spectrometry method. *Food Chemistry* **2017**, 233, 351. [CrossRef] [PubMed]

- ³⁸ Zhao, P.; Zhang, S.; Liu, L.; Pang, X.; Yang, Y.; Lu, J.; Lv, J. Differences in the triacylglycerol and fatty acid compositions of human colostrum and mature milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66*, 4571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹ Xiao, L.; Mjøs, S. A.; Haugsgjerd, B. O. Efficiencies of three common lipid extraction methods evaluated by calculating mass balances of the fatty acids. *Journal of Food Composition and Analysis* **2012**, *25*, 198. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁰ Soxhlet, F. Soxhlet, Über Gewichtsanalytische Bestimmung Des Milchfettes. *Polytechnisches Journal* **1879**, *232*, 461.
- ⁴¹ Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **1957**, *226*, 497. [[PubMed](#)]
- ⁴² Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A. Rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **1959**, *37*, 911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³ Lucas, A.; Gibbs, J. A. H.; Lyster, R. L. J.; Baum, J. D. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *British Medical Journal* **1978**, *1*, 1018. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁴ Rydlewski, A. A.; Silva, P. D.; Manin, L. P.; Tavares, C. B. G.; Paula, M. G.; Figueiredo, I. L.; Neia, V. B. M. J. C.; Santos, O. O.; Visentainer, J. V. Lipid profile determination by direct infusion ESI-MS and fatty acid composition by GC-FID in human milk pools by folch and creatocrit methods. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2019**, *30*, 1063. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁵ Cruz-Hernandez, C.; Goeuriot, S.; Giuffrida, F.; Thakkar, S. K.; Destailats, F. Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1284*, 174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁶ Ten-Doménech, I.; Beltrán-Iturat E.; Herrero-Martínez, J. M.; Sancho-Llopis, J. V.; Simó-Alfonso, E. F. Triacylglycerol analysis in human milk and other mammalian species: small-scale sample preparation, characterization, and statistical classification using HPLC-ELSD profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63*, 5761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Jiang, J.; Wu, K.; Yu, Z.; Ren, Y.; Zhao, Y.; Jiang, Y.; Xu, X.; Li, W.; Jin, Y.; Yuan, J.; Li, D. Changes in fatty acid composition of human milk over lactation stages and relationship with dietary intake in chinese women. *Food & Function* **2016**, *7*, 3154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ Ruiz-Gutiérrez, V.; Pérez-Camino, M. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *Journal of Chromatography A* **2000**, *885*, 321. [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Garwolińska, D.; Hewelt-Belka W.; Namieśnik, J.; Kot-Wasik, A. Rapid characterization of the human breast milk lipidome using a solid-phase microextraction and liquid chromatography–mass spectrometry-based approach. *Journal of Proteome Research* **2017**, *16*, 3200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Tavazzi, I.; Fontannaz, P.; Lee, L. Y.; Giuffrida, F. Quantification of glycerophospholipids and sphingomyelin in human milk and infant formula by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometer detector. *Journal of Chromatography B* **2018**, *1072*, 235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Sokol, E.; Ulven, T.; Færgeman, N. J.; Ejsing, C.S. Comprehensive and quantitative profiling of lipid species in human milk, cow milk and a phospholipid-enriched milk formula by GC and MS/MS. *European Journal of Lipid Science Technology* **2015**, *117*, 751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵² Jurowski, K.; Kochan, K.; Walczak, J.; Barańska, M.; Piekoszewski, W.; Buszewski, B. Analytical techniques in lipidomics: state of the art. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2017**, *47*, 418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ Simionato, J. I.; Garcia, J. C.; dos Santos, G. T.; Oliveira, C. C.; Visentainer, J. V.; de Souza, N. E. Validation of the Determination of Fatty Acids in Milk by Gas Chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2010**, *21*, 520. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁴ Visentainer, J. V.; Franco, M. R. B. Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação. São Paulo, Brazil: Varela, 2006.
- ⁵⁵ Barreiro, R.; Regal, P. López-Racamonde, O.; Cepeda, A.; Fente, C. A. Comparison of the fatty acid profile of Spanish infant formulas and Galician women breast milk. *Journal of Physiology and Biochemistry* **2018**, *74*, 127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ Visentainer, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova* **2012**, *35*, 274. [[Link](#)]
- ⁵⁷ Manin, L. P.; Rydlewski, A. A.; Galuch, M. B.; Pizzo, J. S.; Zappiello, C. D.; Senes, C. E. R.; Santos, O. O.; Visentainer, J. V. Evaluation of the lipid quality of lyophilized pasteurized human milk for six months by GC-FID and ESI-MS *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2019**, *1-8*. [[CrossRef](#)]

- ⁵⁸ Saphier, O.; Blumenfeld, J.; Silberstein, T.; Tzor, T.; Burg, A. Fatty acid composition of breastmilk of Israeli mothers. *Indian Pediatrics* **2013**, *50*, 1044. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁹ Gardner, A.; Rahman, I. A.; Lai, C. T.; Hepworth, A.; Trengove, N.; Hartmann, P. H.; Geddes, D.T. Changes in fatty acid composition of human milk in response to cold-like symptoms in the lactating mother and infant. *Nutrients* **2017**, *9*, 1034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁰ Chuang, C. K.; Yeung, C. Y.; Jim, W. T.; Lin, S. P.; Wang, T. J.; Huang, S. F.; Liu, H. L. Comparison of free fatty acid content of human milk from taiwanese mothers and infant formula. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* **2013**, *52*, 527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶¹ Beggio, M.; Cruz-Hernandez, C.; Golay, P. A.; Lee, L. Y.; Giuffrida F. Quantification of total cholesterol in human milk by gas chromatography. *Journal of Separation Science* **2018**, *41*, 1805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶² Daud, A. Z.; Mohd-Esa, N.; Azlan, A.; Chan, Y. M. The trans fatty acid content in human milk and its association with maternal diet among lactating mothers in malaysia. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **2013**, *22*, 431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶³ Rogozinski, M. A. Rapid quantitative esterification technique for carboxylic acids. *Journal of Chromatography Science* **1964**, *2*, 136.
- ⁶⁴ Hartman, L.; Lago, R. C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice* **1973**, *22*, 475. [[Link](#)]
- ⁶⁵ Park, S. J.; Park, C. W.; Kim, S. J.; Kim, J. K.; Kim, Y. R.; Park, K. A.; Kim, J. O.; Ha, Y. L. J. Methylation Methods for the Quantitative Analysis of Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomers in Various Lipid Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁶ ISO 2002 International Organization for Standarization. ISO 15304:2002.
- ⁶⁷ Maldaner, L.; Fontes, I. C. S. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova* **2009**, *32*, 214. [[Link](#)]
- ⁶⁸ Watson, A. D. Thematic Review Series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *The Journal of Lipid Research* **2006**, *47*, 2101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁹ Checa, A.; Bedia, C.; Jaumot, J. Lipidomic data analysis: Tutorial, practical guidelines and applications. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *885*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁰ Yang, K.; Han, X. Lipidomics: techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences. *Trends in Biochemical Sciences* **2016**, *41*, 954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷¹ Catharino, R. R.; Haddad, R.; Cabrini, L. G.; Cunha, I. B. S.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlin, M.N. Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: classification, quality, adulteration, and aging. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 7429. [[CrossRef](#)]
- ⁷² Cabral, E. C.; da Cruz, G. F.; Simas, R. C.; Sanvido, G. B.; Goncalves, L. D.; Leal, R. V. P.; da Silva, R. C. F.; da Silva, J. C. T.; Barata, L. E. S.; da Cunha, V. S.; de Franca, L. F.; Daroda, R. J.; de Sa, G. F.; Eberlin, M. N. Typification and quality control of the andiroba (*Carapa Guianensis*) oil via mass spectrometry fingerprinting. *Analytical Methods* **2013**, *5*, 1385. [[Link](#)]
- ⁷³ Banerjee, S.; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* **2012**, *2*, 282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁴ Silveira, R.; Vagula, J. M.; Figueiredo I. L.; Claus, T.; Galuch, M. B.; Santos Junior, O.O.; Visentainer, J.V. Rapid methodology via mass spectrometry to quantify addition of soybean oil in extra virgin olive oil: a comparison with traditional methods adopted by food industry to identify fraud. *Food Reserach International* **2017**, *102*, 43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁵ Souza, R.; Cabral, E. C.; Eiras, M. M.; Barata, L. The famous amazonian rosewood essential oil: characterization and adulteration monitoring by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. *Analytical Letters* **2011**, *44*, 2417. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁶ Köfeler, H. C.; Fauland, A.; Rechberger, G. N.; Trötz Müller, M. Mass Spectrometry Based Lipidomics: An Overview of Technological Platforms. *Metabolites* **2012**, *2*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁷ Garcia, J. S.; Sanvido, G. B.; Saraiva, S. A.; Zacca, J. J.; Cosso, R. G.; Eberlin, M. N. Bovine milk powder adulteration with vegetable oils or fats revealed by MALDI-QTOF MS. *Food Chemistry* **2012**, *131*, 722. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁸ Núñez, O.; Moyano, E.; Galceran, M. T. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2005**, *24*, 683. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁹ Ardrey, R. E.; *Espectrometria de massa por cromatografia líquida: uma introdução*. Vol. 2. John Wiley & Sons: New York, 2003.

⁸⁰ Mottram, H. R.; Evershed, R. P. Elucidation of the composition of bovine milk fat triacylglycerols using high-performance liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2001**, 926, 239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁸¹ Gastaldi, D.; Medana, C.; Giancotti, V.; Aigotti, R.; Dal Bello, F.; Baiocchi, C. HPLC-APCI analysis of triacylglycerols in milk fat from different sources. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2011**, 113, 197. [[CrossRef](#)]