



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
MATERNIDADE ESCOLA
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM
SAÚDE PERINATAL**



VÂNIA DE OLIVEIRA TRINTA

**ANÁLISE QUÍMICA DA BIODISPONIBILIDADE DE MICRONUTRIENTES
INORGÂNICOS EM LEITE HUMANO ORDENHADO**

Rio de Janeiro

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
MATERNIDADE ESCOLA
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM SAÚDE PERINATAL

VÂNIA DE OLIVEIRA TRINTA

ANÁLISE QUÍMICA DA BIODISPONIBILIDADE DE MICRONUTRIENTES
INORGÂNICOS EM LEITE HUMANO ORDENHADO

Dissertação desenvolvida no Programa de Mestrado Profissional em Saúde Perinatal da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Patrícia de Carvalho Padilha

Rio de Janeiro

2017

T7372 Trinta, Vânia De Oliveira

Análise química da biodisponibilidade de micronutrientes inorgânicos em leite humano ordenhado/ Vânia De Oliveira Trinta-- Rio de Janeiro: UFRJ/Maternidade Escola, 2017.

105 f. ; 31 cm.

Orientador: Patrícia de Carvalho Padilha

Dissertação (Mestrado em Saúde Perinatal) - Programa de Mestrado Profissional em Saúde Perinatal, Maternidade Escola, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.

Referências bibliográficas: f. 53

1. Leite Humano. 2. Aleitamento Materno. 3.Micronutrientes, 4.Espectrometria de Plasma indutivamente acoplado Gestão Clínica.5. Saúde Perinatal – Dissertação. I. Padilha, Patrícia de Carvalho. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Maternidade Escola. III. Título.



PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DO EXAME DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO PARA A CONCESSÃO DO GRAU
DE MESTRE PROFISSIONAL EM SAÚDE PERINATAL DA

CANDIDATA *Vânia de Oliveira Trinta*

Aos dez dias do mês de março do ano de dois mil e dezessete realizou-se em sessão pública o Exame de Defesa da Dissertação da candidata **Vânia de Oliveira Trinta**, DRE 115120874, no Auditório Nobre da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro, situado na Rua das Laranjeiras, 180, que submeteu sua Dissertação de Mestrado intitulada “Análise química da biodisponibilidade de micronutrientes inorgânicos em leite humano ordenhado”, a uma Banca Examinadora formada pelos Professores: Dra. **Patrícia de Carvalho Padilha**; Dra. **Danielle Aparecida da Silva**; Dra. **Ana Paula Vieira dos Santos Esteves**; Dra. **Halina Cidrini Ferreira** e Dra. **Roseli de Souza Santos da Costa**. O trabalho iniciou-se às 10h com a exposição oral da Dissertação por parte da candidata por cerca de **50** minutos, após o qual os membros da banca examinadora arguíram a candidata e atribuíram a menção:

- APROVADA**, devendo a candidata entregar a versão final no prazo máximo de 60 dias,
 com louvor
 EM EXIGÊNCIA, devendo a candidata satisfazer, no prazo máximo de 90 dias, às exigências listadas na Folha de Modificações de Dissertação de Mestrado anexa à presente ata.
 REPROVADA

Com a concordância de todos os presentes, nada mais havendo a tratar, subscrevemos esta ata.

Rio de Janeiro, 10 de março de 2017.

Prof.^a Dra. Patrícia de Carvalho Padilha (Orientadora e Presidente da Banca)

Ass: *Patrícia de Carvalho Padilha*

Prof.^a Dra. Danielle Aparecida da Silva (Avaliador Titular Externo)

Ass: *Danielle Aparecida da Silva*

Dra. Ana Paula Vieira dos Santos Esteves (Avaliador Titular Interno)

Ass: *Ana Paula Vieira dos Santos Esteves*

Prof.^a Dra. Halina Cidrini Ferreira (Avaliador Suplente Interno)

Ass: *Halina Cidrini Ferreira*

Prof.^a Dra. Roseli de Souza Santos da Costa (Avaliador Suplente Externo)

Ass: _____

Vânia de O. Trinta

Candidata (assinar conforme consta na identidade)

Aos meus dois amores, Alexandre e Luiz Alexandre, por todo carinho, incentivo e paciência durante este caminhar. Sem vocês, eu jamais conseguiria...

AGRADECIMENTOS

A Deus e a São Geraldo Magela, protetor das maternidades.

A minha família: minha torcida organizada e meu porto seguro.

Às mulheres que gentilmente aceitaram participar deste estudo.

Ao professor Joffre e à professora Ana Paula, por todo empenho com que nos acompanharam ao longo deste período. Sonhamos, aprendemos e crescemos juntos. Somos os primeiros frutos desta árvore cujas raízes vocês cuidaram com incansável dedicação, paciência e carinho.

As minhas orientadoras, professoras Patrícia e Cláudia, por terem me conduzido ao longo do caminho com passos firmes e doses extras de carinho, incentivo, paciência, persistência e amizade.

Ao professor Ricardo Erthal Santelli, que dividiu seu sonho conosco, e aos seus discípulos, Aline e Bernardo: vocês fizeram a mágica acontecer.

Aos docentes do Programa de Mestrado Profissional em Saúde Perinatal da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo conhecimento compartilhado.

Aos amigos da primeira turma do Programa de Mestrado Profissional em Saúde Perinatal da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Ter trilhado este caminho com vocês fez toda a diferença! Na árvore do conhecimento, somos agora irmãos de raiz.

Ao meu amigo Maurício Santana, que mais uma vez me mostrou que nossa amizade está à distância de um grito de socorro.

À Secretaria do Programa de Mestrado Profissional em Saúde Perinatal da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro, especialmente ao Pedro, pela dedicação e carinho a nós dispensados.

Às queridas Sonally, Cristiane e Carolina, por toda a ajuda e dedicação na etapa de coleta de dados, mas principalmente, pelo carinho e pelas palavras de incentivo.

Às colegas de equipe do Serviço de Nutrição da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O apoio, a torcida e o incentivo que vocês me deram foi muito importante para que eu pudesse concluir esta etapa.

Às meninas da Biblioteca Jorge de Rezende, especialmente à Nazareth e à Márcia, pela ajuda na busca bibliográfica e na formatação deste trabalho, respectivamente.

A minha querida equipe do Banco de Leite/Lactário da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que mais uma vez torceu por mim, me apoiou e me incentivou.

Aos queridos Silvana Argemiro, Carlos Moura, Cláudio Vasques e Maurício Benelis, por toda ajuda, força e incentivo ao longo deste caminhar.

Aos amigos da Maternidade Escola, da Rede Global de Bancos de Leite Humano, da Comissão Estadual de Bancos de Leite Humano do Rio de Janeiro e do Grupo Técnico de Aleitamento Materno da Secretaria de Estado do Rio de Janeiro, por fazerem parte da minha trajetória.

Que mistério é este que me faz produzir o que te alimenta?

Mariana Ferrão

RESUMO

TRINTA, Vânia de Oliveira. **Análise química da biodisponibilidade de micronutrientes inorgânicos em leite humano ordenhado**. 100 f. 2017. Dissertação (Mestrado em Saúde Perinatal) - Programa de Mestrado Profissional em Saúde Perinatal, Maternidade Escola, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O emprego de análises de especiação química com utilização da técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado tem gerado novos conhecimentos na área da Saúde sobre a composição química de micronutrientes e sua associação a biomoléculas no leite humano. Este estudo objetivou quantificar os teores de ferro, de cobre, de zinco e de iodo e realizar a especiação destes elementos no leite cru de puérperas adultas da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, que tiveram parto pré-termo e a termo nas fases de colostro, leite de transição e leite maduro. Os teores encontrados de ferro, de cobre, de zinco e de iodo no leite das puérperas de parto prematuro e de parto a termo foram: 0,9967mg/L e 0,7369mg/L; 0,5058mg/L e 0,2338mg/L; 4,4158mg/L e 2,9062mg/L; 0,4575mg/L e 0,2685mg/L. A análise de especiação evidenciou os padrões de associações de ferro, de cobre, de zinco e de iodo a biomoléculas presentes nas amostras de leite cru de puérperas de parto prematuro e de parto a termo.

Palavras-chave: Leite Humano. Aleitamento Materno. Micronutrientes. Espectrometria de Plasma Indutivamente Acoplado.

ABSTRACT

New knowledge on the chemical composition of micronutrients and its association with biomolecules in human milk has been generated by using inductively coupled plasma mass spectrometry. The objective of the study was to quantify the iron, copper, zinc and iodine contents and to perform the speciation of these elements in raw milk of preterm and full term adult mothers in the Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, in phases of colostrum, transitional milk and mature milk. The iron, copper, zinc and iodine levels found in the milk of the preterm and full term delivery mothers were: 0.9967mg/L and 0.7369mg/L; 0.5058mg/L and 0.2338mg/L; 4.4158mg/L and 2.9062mg/L; 0.4575mg/L and 0.2685mg/L. The patterns of iron, copper, zinc and iodine associations to biomolecules, present in raw milk samples of the preterm and full term delivery mothers, were evidenced by speciation analysis.

Keywords: Human Milk. Breastfeeding. Micronutrients. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação de um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)25
Figura 2	HPLC (High Performance Liquid Chromatography) acoplado ao ICP-MS Thermo Scientific 131 iCap Qc (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) – Lada, UFRJ33
Quadro 1	Fluxograma de distribuição das amostras para análise, segundo estágio de maturação do leite humano31
Quadro 2	Fluxograma de análise de amostras de leite humano.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização das puérperas, segundo variáveis sócio-demográficas e obstétricas	38
Tabela 2	Caracterização da amostra, segundo níveis de ferro (Fe), cobre (Cu), Zinco (Zn) e Iodo (I)	39
Tabela 3	Especiação de ferro em amostras de leite humano cru segundo distribuição por faixas de peso molecular	40
Tabela 4	Especiação de cobre em amostras de leite humano cru segundo distribuição por faixas de peso molecular	41
Tabela 5	Especiação de zinco em amostras de leite humano cru segundo distribuição por faixas de peso molecular	42
Tabela 6	Especiação de iodo em amostras de leite humano cru segundo distribuição por faixas de peso molecular	43

LISTA DE SIGLAS

PNIAM	Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno
RBLH-Br	Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano
RBLH	Rede Global de Bancos de Leite Humano
OMS	Organização Mundial da Saúde
DCNT	Doenças Crônico-Degenerativas Não Transmissíveis
ROS	Espécie Reativa De Oxigênio
IgA	Imunoglobulina A
Fe	Ferro
Cu	Cobre
Zn	Zinco
I	Iodo
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> = Espectrometria De Massa Com Plasma Indutivamente Acoplado
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> = Cromatografia Por Exclusão De Tamanho
LaDA	Laboratório de Desenvolvimento Analítico do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro
KDa	Quilo Dalton
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Leite Humano	17
2.2	Leite Humano e Prematuridade.....	18
2.3	Fórmulas Industrializadas.....	21
2.4	Importância dos Minerais Ferro, Cobre, Zinco e Iodo na Nutrição do Prematuro	22
2.5	Uso da Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP- MS).....	24
3	JUSTIFICATIVA	27
3.1	OBJETIVOS	27
3.1.1	Objetivo Geral	27
3.1.2	Objetivos Específicos	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Coleta das Amostras.....	29
4.2	Análise de Especificação Química.....	31
4.3	Questões Éticas	34
4.4	Análise dos Resultados.....	35
5	RESULTADO	36
6	DISCUSSÃO	44
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICE A - Projeto Aplicativo.....	57
	APÊNDICE B – Cartilha	80
	APÊNDICE C – Artigo.....	82
	ANEXO A – Parecer Consubstanciado	103

1 INTRODUÇÃO

A nutrição adequada é de extrema importância na atenção ao prematuro. A exemplo de carboidratos, proteínas e lipídios, é necessária a oferta apropriada de micronutrientes, para dar suporte ao pleno desenvolvimento, à taxa de crescimento acelerado e à proteção contra infecções. O recém-nascido prematuro inspira atenção maior no que tange ao cuidado nutricional, pois apresenta risco aumentado para carências de vitaminas e minerais.

Estudos revelam a existência de uma complexa interação entre nutrientes e genes e, portanto, a nutrição recebida na fase precoce da vida ou em períodos críticos do desenvolvimento pode afetar a expressão genética do indivíduo.

Assim, o desequilíbrio nutricional nestas situações, seja tanto pela oferta excessiva quanto pela oferta deficiente de nutrientes, pode gerar alterações na diferenciação celular e no desenvolvimento tecidual, causando danos que irão impactar negativamente sobre a saúde em fases posteriores da vida. A relação entre nutrição na fase inicial precoce da vida e o genoma influencia os mecanismos disparadores dos processos de saúde e de doença do indivíduo. Quando desfavorável esta interação abre campo para o surgimento de doenças que representam os principais problemas de saúde pública no cenário mundial: obesidade, distúrbios cardiovasculares, doenças imunes e autoimunes, doenças neurológicas e neurodegenerativas e alguns tipos de câncer.

O leite materno é mais que um alimento seguro: trata-se de um complexo sistema biológico que confere ao recém-nascido nutrição e proteção contra doenças transmissíveis e não transmissíveis (ALMEIDA, 1999). Além de atender aos requisitos nutricionais e imunológicos do bebê, é compatível ao desenvolvimento do trato gastrointestinal imaturo (JAKAITIS; DENNING, 2014; MARTIN; LING; BLACKBURN, 2016). A alimentação com leite humano respeita a programação metabólica inicial do indivíduo, auxilia sua maturação e favorece o desenvolvimento adaptativo do recém-nascido, promovendo impacto positivo na sua saúde, não apenas no início precoce da vida pós-natal, mas também ao longo prazo, ou seja, na fase adulta (ZHOU et al., 2015). Tais benefícios tornam o leite materno a melhor opção de nutrição do lactente, especialmente nas situações de nascimento prematuro (BRASIL, 2013; PRENTICE et al., 2016).

Para melhor atender às necessidades nutricionais imunológicas e antioxidantes do lactente ao longo do seu desenvolvimento, a composição do leite materno se modifica com o tempo, a partir do colostro até atingir o estágio chamado de maduro, tendo uma ampla variação no volume produzido (ANVISA, 2008; BALLARD; MORROW, 2013; PRENTICE

et al., 2016; LÖNNERDAL, 2014). No colostro, observa-se um maior teor protéico, ao passo que o leite maduro fornece um maior aporte de gordura.

Do ponto de vista nutricional, o papel dos micronutrientes presentes no leite humano merece maiores estudos, quando comparados aos macronutrientes, especialmente entre prematuros, e tem-se observado um interesse cada vez maior por esta temática, em virtude do seu impacto na saúde (FERNÁNDEZ-MENÉNDEZ et al., 2016). Enquanto que a composição dos macronutrientes é amplamente discutida em termos tanto quantitativos quanto qualitativos, os micronutrientes usualmente são abordados unicamente em termos quantitativos, sob a ótica de padrões de recomendações de ingestão diária (REMY et al., 2004).

Ainda que quantitativamente as fórmulas industrializadas atendam às normativas do *Codex Alimentarius*, do ponto de vista qualitativo, o produto traz desvantagens ao ser comparado ao leite humano, como a ausência de fatores de defesa, o risco aumentado para o surgimento de infecções do trato gastrintestinal e respiratório, alergias e inadequações nutricionais (GONÇALVES; MELO, 2014; ARPINI; ARPINI, 2014).

Na abordagem nutricional de prematuros, os aspectos qualitativos ganham especial destaque, por estes serem indivíduos naturalmente mais desprotegidos e suscetíveis às complicações decorrentes de processos inflamatórios e infecciosos ou da oferta de nutrição que não seja a mais adequada para dar suporte as suas necessidades. Neste sentido, a biodisponibilidade dos elementos traço presentes no leite humano é um dos fatores que destacam seus atributos de qualidade frente aos requisitos do prematuro (JAKAITIS; DENNING, 2014; ZHOU et al., 2015; MARTIN; LING; BLACKBURN, 2016; PRENTICE et al., 2016), pois permite um aproveitamento mais eficiente destes micronutrientes, ainda que quantitativamente seus teores sejam inferiores aos do produto industrializado.

No campo da ciência dos alimentos e da nutrição, a identificação e a quantificação de formas químicas individuais dos nutrientes inorgânicos, como a associação a biomoléculas, tem se revelado cada vez mais impactante do que o conhecimento isolado sobre a composição elementar de nutrientes, tendo em vista a atuação das espécies químicas individuais nos processos metabólicos. Isso poderia explicar por que os micronutrientes do leite humano, mesmo quando em quantidades totais inferiores às das fórmulas industrializadas, são melhor aproveitados pelos lactentes. O desenvolvimento de novas técnicas analíticas tem beneficiado gradativamente a disseminação de conhecimento sobre a especificação de elementos em áreas como a da Saúde e a da Ciência dos Alimentos (REMY et al., 2004; FERNÁNDEZ-

SÁNCHEZ et al., 2012; FERNÁNDEZ-MENÉNDEZ et al., 2016), permitindo uma nova percepção sobre composição nutricional.

O aumento alarmante das taxas de morbi-mortalidade infantil a partir da década de 1940, especialmente nos anos de 1970 (ALMEIDA, 1999) fez florescer, a partir do início da década de 1980, a adoção de ações e políticas públicas em prol do aleitamento materno, destacando-se o Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (PNIAM), o grupo de apoio Amigas do Peito, a Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (rBLH-Br) e a iniciativa hospital amigo da criança. Dentre os objetivos destas ações e políticas públicas está a realização de condutas para tornar o leite humano acessível ao maior número possível de recém-nascidos e lactentes, incluindo aqueles em situações de prematuridade e internados em unidades de terapia intensiva neonatal (ANVISA, 2006; 2008; BRASIL, 2013).

As particularidades que rondam a internação de prematuros nas unidades de neonatologia acarretam uma taxa de aleitamento menor que a observada entre nascidos a termo e que praticam Alojamento Conjunto (*AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS*, 2012). Por parte das mães, há o estresse advindo de fatores tais como o medo que as próprias unidades provocam, por serem ambientes onde vida e morte convivem de forma próxima, o medo do apego ao filho que talvez não sobreviva, os termos desconhecidos e a ansiedade em ordenhar o volume prescrito, constituindo-se em fatores que comprometem a produção de leite. Por parte das instituições, há barreiras que impedem a permanência integral da mãe durante toda a internação do filho, a falta de apoio a ações que promovam o aleitamento e a opção pela segurança na prescrição, advinda da abordagem quantitativa das fórmulas industrializadas, em cujos rótulos é possível encontrar níveis aumentados de micronutrientes (SASSÁ et al., 2014).

Nos seus mais de trinta anos de existência, a rede brasileira de bancos de leite humano tem trabalhado efetivamente em prol do aleitamento materno e da saúde do grupo materno-infantil, difundindo o uso do leite humano como um alimento funcional. Sob esta ótica, dentre os compromissos assumidos na Carta de Brasília de 2015, pelos representantes de 22 países que integram a hoje denominada Rede Global de Bancos de Leite Humano (rBLH), está, no seu quinto item, o acordo de “Fomentar a pesquisa científica e o desenvolvimento tecnológico voltados à ampliação do uso do leite humano como alimento funcional e recurso terapêutico para recém-nascidos e lactentes” (REDE BRASILEIRA DE BANCO DE LEITE, 2015, p.1).

A avaliação da biodisponibilidade de micronutrientes inorgânicos, através do emprego da análise química de especiação, poderá apontar a biodisponibilidade de elementos traço no leite humano. A realização de estudos desta natureza vai ao encontro do

compromisso assumido pela Rede Global de Bancos de Leite Humano, por apresentar potencial para contribuir cientificamente com as discussões sobre o incremento do uso terapêutico do leite humano.

A percepção dos micronutrientes inorgânicos sob a ótica qualitativa, poderá trazer novo embasamento às discussões sobre práticas assistenciais ao prematuro no âmbito da nutrição, colaborando para o fortalecimento da opção pelo leite humano como recurso terapêutico no ambiente das Unidades de Neonatologia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leite Humano

Nos primeiros seis meses de vida, a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) é a oferta exclusiva de leite materno, que é indicado como o alimento mais natural e seguro a ser utilizado neste período (ANVISA, 2008; 2014; BRASIL, 2010; 2013; 2014; 2015; TURIN; OCHOA, 2014), após o qual deve ser complementado e continuado até os dois anos ou mais (BRASIL, 2015). Estudos reconhecem que a nutrição precoce pós-natal, além de promover de forma adequada o crescimento e o desenvolvimento do lactente, também oferece benefícios que serão percebidos na fase adulta (*AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS*, 2012; PRENTICE et al., 2016).

Dentre os atributos de qualidade do leite humano, destacam-se o fato de respeitar a imaturidade gastrointestinal do recém-nascido, fortalecer seu sistema imune igualmente imaturo, bem como propiciar benefícios psicológicos e emocionais (JAKAITIS; DENNING, 2014; MARTIN; LING; BLACKBURN, 2016). Ainda, o impacto sobre a saúde do indivíduo nutrido com leite humano não se restringe à etapa inicial da vida pós-natal, mas sim, repercute ao longo prazo, programando a qualidade de vida na fase adulta, ao diminuir o risco de ocorrência de obesidade, de leucemia, de linfomas, de doenças inflamatórias intestinais, de distúrbios cardiovasculares e de doenças crônico-degenerativas não transmissíveis (DCNT) (*AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS*, 2012; PRENTICE et al., 2016).

O leite materno é um sistema bioativo e dinâmico (ALMEIDA, 1999; ALMEIDA; NOVAK, 2004; TURIN; OCHOA, 2014), que para melhor atender às necessidades nutricionais e imunológicas do lactente ao longo do seu desenvolvimento, tem sua composição modificada, desde colostro até leite maduro. Assim, do parto até o término da lactação, há a produção, por parte da mãe, de um alimento funcional espécie-específico, ajustado às demandas de crescimento e de desenvolvimento do seu filho.

No colostro, observa-se um maior teor protéico e maior quantidade de imunoglobulinas e minerais, ao passo que o leite maduro fornece um maior aporte de gordura (BRASIL, 2015; TURIN; OCHOA, 2014). A maior quantidade de agentes de defesa, presentes no colostro, evidencia a perfeita sincronia entre a composição do leite que inicialmente é produzido e a fase de adaptação do recém-nascido ao ambiente extra-uterino, indicando que a primeira função do leite materno é imunizar e estimular o trofismo e a

colonização do trato gastrointestinal, preparando-o para a etapa posterior, que é a nutrição e o ganho de peso (TURIN; OCHOA, 2014).

O teor de lipídios e de proteínas do leite humano pode estar associado ao menor risco de ganho de peso excessivo e de adiposidade (PRENTICE et al., 2016). O conteúdo de minerais do leite humano corresponde a cerca de 1/3 do existente no leite de vaca. Esta característica, aliada ao menor teor de proteínas, o qual é compatível ao ritmo de crescimento de nossa espécie, confere sincronia entre a carga de solutos da dieta e a imatura função renal do lactente (BALDAN; FARIAS; BÁCARO, 2013; BRASIL, 2013).

2.2 Leite Humano e Prematuridade

O leite humano contém inúmeros elementos que promovem não somente a nutrição adequada, mas também a efetiva proteção contra processos infecciosos e inflamatórios. Ainda, contém bifidobactérias, que irão estimular a colonização saudável do intestino do prematuro e o desenvolvimento de seu sistema imunológico (CASTELLOTE, et al., 2011; BALLARD; MORROW, 2013).

Nos casos de prematuridade, há um risco aumentado para ocorrência de infecções, que tendem a cursar com maior gravidade, pois além da condição de acentuada vulnerabilidade, o recém-nascido é introduzido de forma precoce à vida extra-uterina, tendo de responder abruptamente a esta (BRASIL, 2013; PRENTICE et al., 2016). Assim como o sistema imune, também o trato gastrointestinal é forçado a se adaptar precoce e rapidamente, iniciando suas funções sem estar totalmente desenvolvido (JAKAITIS; DENNING, 2014).

Por sua composição rica e complexa, o leite humano confere à saúde do prematuro inúmeros benefícios, diminuindo o risco de agravos tais como enterocolite necrozante e demais doenças do trato gastrointestinal, retinopatia da prematuridade, síndrome metabólica e deficiências neurodesenvolvimentais (*AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS*, 2012).

É no terceiro trimestre da gestação que dá-se mais efetivamente a transferência mãe-filho de agentes com função antioxidante e imunobiológicos, num preparo fisiológico para o parto (NOGUEIRA; BORGES; RAMALHO, 2010). Este preparo é importante, pois o nascimento representa para o bebê uma condição de estresse oxidativo e de exposição aos microrganismos do meio extra-uterino.

As reações induzidas pelos radicais livres geram produtos oxidativos, capazes de lesar estruturas celulares e teciduais. A estes efeitos nocivos dá-se o nome de estresse oxidativo

(SARNI et al., 2010). Se em quantidades normais os radicais livres representam um estímulo para o adequado funcionamento do sistema imunológico, na vigência de situações nas quais as defesas antioxidantes estão diminuídas, tem-se o efeito oposto.

No caso do nascimento prematuro, o estresse oxidativo encontra cenário mais favorável a sua ocorrência, a qual acontece de forma mais exacerbada (NOGUEIRA; BORGES; RAMALHO, 2010), e com maior impacto adverso. Esta exacerbção dá-se em função da sobreposição de duas condições desfavoráveis ao prematuro: excesso de produção de elementos oxidantes e carência de defesas para combatê-los. Uma vez que a gestação é finalizada antes do termo, o prematuro não tem o apropriado tempo para preparar seu sistema imunológico e o mecanismo próprio de defesa contra a agressão oxidativa, ao passo em que é privado da transferência materna de tais benefícios (OVEISI et al., 2010).

Na vigência do estresse oxidativo, há a ocorrência de uma situação fisiológica na qual observa-se o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS). Para cessar este processo, há a necessidade de agentes antioxidantes. A ausência desta defesa implica no aumento de peroxidação lipídica, com formação de produtos tóxicos, que irão agredir as membranas celulares (NOGUEIRA; BORGES; RAMALHO, 2010; SARNI et al., 2010). Desta forma, está aberto o caminho para o surgimento de lesão aguda.

A prematuridade, por si só, traz consigo uma condição de vulnerabilidade do sistema antioxidante. Ao associarmos a esta vulnerabilidade o fato de que muitas vezes o recém-nascido prematuro necessita da introdução da oxigenoterapia, teremos um cenário de formação de grande quantidade de radicais livres. Portanto, o prematuro é mais susceptível a danos oxidativos das mucosas, que lesionadas, perdem sua integridade e ficam mais expostas, aumentando o risco de doenças como a retinopatia da prematuridade, doença pulmonar crônica e enterocolite necrosante (OVEISI et al., 2010).

Em sua composição, o leite humano possui um arsenal antioxidante, capaz de cessar e prevenir os danos oriundos da agressão celular promovida pelo estresse oxidativo. Além de agentes enzimáticos, como a glutathione, a superóxido dismutase e catalases, também estão presentes defesas não enzimáticas, como as vitaminas A, E e C, e os minerais zinco e cobre (TRINDADE, 2005). Por este motivo, representa a nutrição mais adequada para dar suporte à demanda antioxidante do prematuro.

O leite humano supre necessidades do prematuro que vão além da alimentação e da nutrição (BALLARD; MORROW, 2013). Os fatores de proteção presentes no leite humano são inúmeros, e incluem componentes celulares, oligossacarídeos, lipídios, hormônios, bífidobactérias, componentes do sistema complemento, imunoglobulinas e enzimas bioativas

(JAKAITIS; DENNING, 2014), que agem tanto isoladamente quanto de forma sinérgica. Os fatores de proteção estão em maiores níveis no leite de mulheres que tiveram o parto prematuro do que no leite daquelas que tiveram o parto a termo, como um mecanismo de compensação frente ao tempo de gestação encurtado (CASTELLOTE et al., 2011; TURIN; OCHOA, 2014).

As imunoglobulinas conferem imunidade passiva e estímulo ao desenvolvimento intestinal do prematuro, sendo que a do tipo A (IgA) encontra-se em maior quantidade que as demais (CASTELLOTE et al., 2011; JAKAITIS; DENNING, 2014). A IgA encontrada no leite humano é do tipo secretória, produzida na glândula mamária pelos plasmócitos provenientes principalmente do tecido linfóide do intestino materno, constituindo o chamado ciclo bronquioenteromamário. Desta forma, ao amamentar seu bebê, a mãe lhe transfere sua história imunológica (BRASIL, 2013).

O leite humano possui grande quantidade de proteínas com ação bioativa, (CASTELLOTE et al., 2011; LÖNNERDAL, 2016), bem como α -antitripsina e α 1-antiquimotripsina, agentes que limitam a degradação protéica, e que estão aumentados no leite de mulheres que tiveram parto prematuro (LÖNNERDAL, 2016). A diminuição da proteólise é um fator importante para o desenvolvimento do recém-nascido, pois preserva a ação bioativa de proteínas como lizosima, lactoferrina e caseína.

A lactoferrina possui capacidade de quelar o ferro, impedindo-o de circular livre no organismo. Tal propriedade preserva a biodisponibilidade do micronutriente, aumentando seu aproveitamento pelo prematuro. A ação bacteriostática da lactoferrina dá-se também através da capacidade quelante da proteína, pois impede a utilização do ferro livre por enterobactérias patogênicas, restringindo assim seu crescimento (JAKAITIS; DENNING, 2014; LÖNNERDAL, 2016).

Além de restringir o crescimento microbiano, a lactoferrina desempenha importante função na maturação intestinal do prematuro (JAKAITIS; DENNING, 2014). No intestino, a lactoferrina se liga a sítios específicos, e ao ser metabolizada, participa dos processos de diferenciação e de proliferação celular. Ainda, por afetar a expressão de citocinas, a lactoferrina possui também a propriedade de modular a resposta imune do prematuro.

O crescimento e o desenvolvimento intestinal do prematuro são beneficiados pela velocidade da proteólise, a qual vai aumentando ao longo do crescimento do bebê e do curso da lactação (LÖNNERDAL, 2016). Assim, na fase de colostro, o leite materno apresenta concentração aumentada de lactoferrina e de agentes limitadores de proteólise, ao passo que o prematuro recém-nascido apresenta baixa capacidade de metabolização de proteínas advindas

da dieta. Esta combinação resulta em degradação proteolítica mais baixa, a qual favorece a promoção do crescimento intestinal. Com o avanço do tempo, os níveis de lactoferrina, bem como de α -antitripsina e α 1-antiquimotripsina, decaem, enquanto o prematuro vai aumentando a eficiência de metabolização de proteínas. Desta forma, há um aumento da proteólise, fator estimulador para a diferenciação celular melhorada do epitélio intestinal.

A lisozima atua rompendo a membrana celular das bactérias Gram positivas, e a maior concentração conhecida desta enzima está no leite humano. A lisozima potencializa a ação da IgA e do complemento, e atua de forma sinérgica com a lactoferrina sobre bactérias Gram negativas, como *Salmonella typhimurium* e *E. coli* (JAKAITIS; DENNING, 2014; LÖNNERDAL, 2016).

O uso do leite materno durante o período de internação na unidade de terapia intensiva, além de facilitar o apego mãe-filho, proporciona melhor resposta à terapia medicamentosa, evita deficiências nutricionais, reduz o tempo de internação e diminui o risco de reinternações após a alta hospitalar, tornando-o o melhor alimento a ser administrado ao prematuro neste período (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2012; BRASIL, 2013; PRENTICE et al., 2016).

2.3 Fórmulas Industrializadas

Fatores como o desenvolvimento da indústria de alimentos, a inserção da mulher no mercado de trabalho e o marketing abusivo em torno de sucedâneos do leite materno, foram tornando o desmame uma prática cada vez mais precoce e recorrente, com predomínio do aleitamento artificial (BALDAN; FARIAS; BÁCARO, 2013; ALMEIDA; NOVAK, 2004). Desta forma, observou-se um aumento alarmante das taxas de morbi-mortalidade infantil a partir da década de 1940, especialmente nos anos de 1970 (ALMEIDA, 1999).

Enquanto que o leite humano sofre gradualmente transformações em sua composição ao longo da lactação, adequando-se às demandas nutricionais e imunológicas do desenvolvimento do lactente (BALLARD; MORROW, 2013), o mesmo não acontece com as fórmulas industrializadas: estas são desenvolvidas para atender perfis determinados, apresentando um padrão de composição obediente às recomendações de ingesta nutricional.

As fórmulas infantis corriqueiramente mais utilizadas são produtos à base de leite de vaca. Ao longo do processo industrial, este leite é modificado, no intuito de melhorar sua

digestibilidade e aproximá-lo da composição nutricional do leite humano (MARTIN; LING; BLACKBURN, 2016). Desta forma, as modificações mais comuns são:

- proteínas: redução do teor total de proteínas e acréscimo de proteínas do soro, para aumentar a proporção destas em relação à quantidade de caseína, visando melhorar a digestibilidade do produto. Aminoácidos também costumam ser acrescentados, especialmente a taurina, essencial para o desenvolvimento do tecido nervoso.
- lipídios: inicialmente o leite é desnatado, e posteriormente recebe óleos vegetais poliinsaturados, para melhorar o perfil lipídico e a digestibilidade da fórmula. Alguns produtos utilizam também óleo de peixe e gordura láctea em sua composição, para aumentar a oferta de ácidos graxos essenciais.
- glicídios: as fórmulas podem utilizar tanto a lactose, a exemplo do leite humano, como mistura de glicídios (maltodextrina/maltose/lactose) ou mesmo apenas a maltodextrina.
- vitaminas: são acrescentadas, para atender às recomendações nutricionais.
- minerais: o conteúdo mineral do leite integral é reduzido e aproximado ao teor de minerais do leite humano. A maioria das fórmulas recebe acréscimo de ferro.

Apesar de atenderem às recomendações preconizadas no *Codex Alimentarius* (GONÇALVES; MELO, 2014; ARPINI; ARPINI, 2014), as fórmulas infantis industrializadas destacam-se do leite humano pela ausência de fatores de proteção, bem como pelo risco aumentado para o surgimento de infecções do trato gastrointestinal e respiratório, alergias e inadequações nutricionais.

Estas características evidenciam a situação de desvantagem das fórmulas em relação ao leite materno (LÖNNERDAL, 2014) na promoção de saúde, à luz da segurança alimentar. A desvantagem torna-se mais expressiva quando extrapolamos a questão para o prematuro, pois a alimentação artificial não é capaz de atender à demanda nutricional e imunológica deste grupo com a mesma eficiência que o leite humano (BALLARD; MORROW, 2013).

2.4 Importância dos Minerais Ferro, Cobre, Zinco e Iodo na Nutrição do Prematuro

O colostro apresenta uma concentração mineral superior a do leite maduro; todavia, de uma forma geral, as necessidades do lactente são satisfeitas até os 6 meses, sem sintomas de deficiência (BRASIL, 2015).

Os prematuros necessitam, a exemplo da adequação do teor de macronutrientes, de um aporte ajustado de micronutrientes, para dar suporte ao seu desenvolvimento pleno, tendo em vista sua elevada taxa de crescimento. Ainda, por estes serem os organismos mais sensíveis às deficiências de elementos essenciais e às infecções, a nutrição possui particular papel de destaque (MORGANO et al., 2005).

Por apresentar baixos estoques de oligoelementos ao nascimento, ao mesmo tempo em que sofre maior demanda de mobilização de micronutrientes, o prematuro está exposto a um risco aumentado para desenvolver carências, ainda que as mesmas não cursem com quadro clínico explícito (TRINDADE, 2005).

Ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e iodo (I) são chamados de micronutrientes, oligoelementos ou elementos traço (TRINDADE, 2005). Apesar de serem necessários em pequenas quantidades, sua deficiência compromete o bom funcionamento do organismo, já que estes minerais atuam em diversas e importantes vias metabólicas. Níveis adequados de ferro, de cobre e de iodo são necessários à manutenção dos processos metabólicos, desenvolvimento tecidual e crescimento pleno do lactente, especialmente nos casos de prematuros (REMY et al., 2004).

O iodo destaca-se por apresentar importante papel nas funções cognitivas, neurológicas e motoras do lactente (CAMPOS; RAMOS, 2013); portanto, deve estar presente em níveis adequados e com boa biodisponibilidade na dieta do prematuro, para evitar déficits em fases posteriores do desenvolvimento neuropsicomotor.

Além de colaborar com a função de oxigenação do sangue, através da participação na formação das hemácias, o cobre desempenha papel de destaque nos processos de cicatrização tecidual e de produção de energia (NOGUEIRA; BORGES; RAMALHO, 2010).

O zinco é um importante cofator de enzimas de ação reparadora, e, portanto, faz-se necessário aos processos de reparação e cicatrização tecidual. Inúmeros processos metabólicos são dependentes deste nutriente, como os processos de divisão celular, síntese de proteínas do DNA e manutenção das funções cerebrais (YANAGISAWA, 2008; FERNÁNDEZ-MENÉNDEZ et al., 2016). O zinco desempenha papel de destaque nos processos relacionados à imunidade, seja adaptativa ou inata, pois participa da formação de proteínas de fase aguda, agentes de funções imunológicas, bem como do metabolismo da vitamina A, a qual, por sua vez, atua como importante fator de proteção imunológica e na integridade da visão (YANAGISAWA, 2008; MELLO; COELHO, 2011).

Níveis inadequados de ferro causam anemia e prejuízos que podem comprometer tanto o desenvolvimento físico quanto intelectual do lactente (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al.,

2012). Seu conteúdo no leite humano, em valor absoluto, é reduzido, assim como no leite de vaca. Entretanto, o menor teor de proteínas e fósforo, aliado às concentrações aumentadas de vitamina C e lactose, conferem ao ferro proveniente do leite materno uma maior biodisponibilidade, e dessa forma, o aleitamento materno exclusivo representa menor risco de anemia antes dos seis (6) meses. O baixo teor de ferro no leite humano, na realidade, configura-se em benefício que é especialmente importante à saúde do prematuro: preserva a ação bacteriostática da lactoferrina, por mantê-la em sua forma insaturada (BALDAN; FARIAS; BÁCARO, 2013).

Juntamente com as vitaminas A, E e C, os minerais zinco e cobre constituem as defesas não enzimáticas do organismo (NOGUEIRA; BORGES; RAMALHO, 2010), e são transferidos da mãe para o filho com maior eficiência no terceiro trimestre da gestação. Quando o parto ocorre antes da 37^a semana de gestação, o recém-nascido não possui tempo hábil para se beneficiar da transferência de agentes de defesa antioxidante. Portanto, este aspecto deverá ser contemplado no cuidado nutricional, principalmente em se tratando de prematuro sob oxigenoterapia, quando há maior formação de radicais livres.

Na complexa relação entre nutrição e sistema imunológico do prematuro, observam-se 3 condições favoráveis ao surgimento de agravos: níveis inadequados de nutrientes, estresse oxidativo exacerbado e ocorrência de processos infecciosos e inflamatórios (SARNI et al., 2010).

No leite da nutriz que teve o parto antes do termo, zinco, cobre e ferro estão presentes conjuntamente, em quantidades adequadas e com alta biodisponibilidade, para atuarem de maneira sinérgica nos processos imunológicos e antioxidantes, compensando o menor tempo de duração da gestação e protegendo e fortalecendo o prematuro contra carências nutricionais, danos oxidativos e infecções.

2.5 Uso da Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)

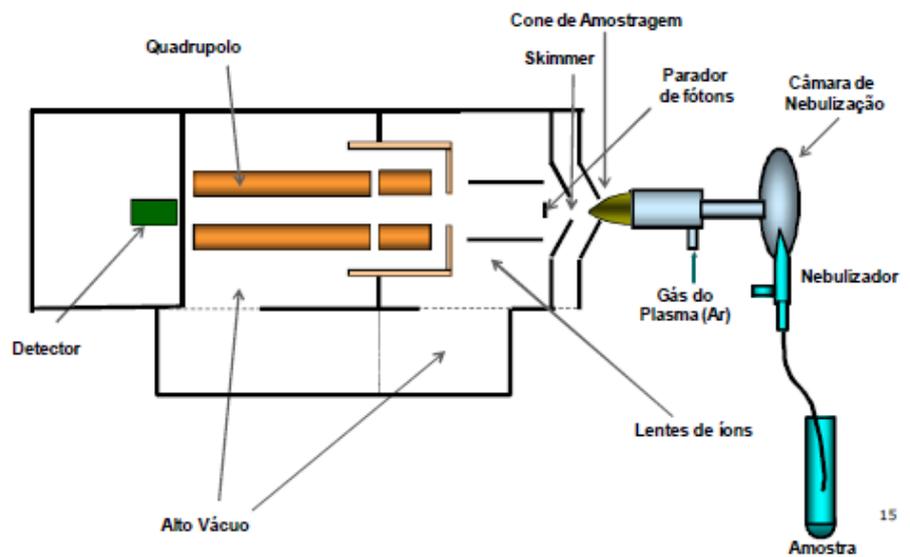
A dosagem de elementos traço no leite humano apresenta como principais fatores complicadores a quantidade restrita de micronutrientes presentes no leite, a complexa composição do leite e a coleta de amostras de volume pequeno. Nascimento et al., (2008) destacam que, além de conseguir superar estes obstáculos, a técnica de dosagem deve obedecer também a outros critérios, tais como: apresentar alta sensibilidade e seletividade, não sofrer interferências do meio, ser simples e de fácil execução, ser rápida, ser capaz de

detectar vários elementos, usar o mínimo de reagentes e requerer mínima manipulação da amostra.

A técnica analítica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) apresenta alta sensibilidade, acurácia e reprodutibilidade (MOHD-TAUFEEK et al., 2016), e por suas características, tem sido empregada cada vez mais em análises de determinação de elementos traço em leite humano, enriquecendo os conhecimentos sobre sua composição nutricional.

A amostra é injetada no aparelho, nebulizada, misturada ao plasma de argônio e, sob pressão, é transformada em íons (ICP). Estes íons seguem em movimento pelo aparelho, sob vácuo, e são separados com base em suas razões de massa/carga (m/z) (MS). A figura 1 ilustra um ICP-MS:

Figura 1 - Representação de um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)



Fonte: Reis; Gonçalves (2015)

Como exemplos recentes de utilização do ICP-MS para determinar elementos traço no leite humano, temos o trabalho de Winiarska-Mieczan (2014) e Mohd-Taufek et al. (2016).

No Brasil, Nascimento et al. (2008) empregaram o ICP-MS para validar metodologia de determinação de bário, de vanádio, de selênio, de cromo, de níquel, de manganês, de

chumbo, de cobre, de cobalto, de cádmio, de arsênio, de ferro, de zinco e de alumínio em leite humano. Andrade, et al., (2014) utilizaram o ICP-MS para dosar micronutrientes no leite materno de mulheres na faixa etária de 16 a 39 anos, tendo encontrado como valores médios 2,65mg/L para ferro, 0,37mg/L para cobre e 2,50mg/L para zinco. Em ambos os estudos, apenas a quantificação foi determinada, não tendo sido realizada a especiação dos micronutrientes estudados.

A análise quantitativa de um elemento químico presente em determinada amostra, isoladamente, não fornece informações sobre a toxicidade e a biodisponibilidade do mesmo. A identificação da forma físico-química particular em que o elemento se encontra é o que determina a sua biodisponibilidade, atividade biológica, transporte e metabolismo, bem como a sua toxicidade (REMY et al., 2004).

As técnicas de especiação química têm por objetivo identificar e quantificar as várias formas de um elemento químico se apresentar em uma determinada amostra, as quais, em conjunto, constituem a concentração total daquele elemento na referida amostra (REIS; GONÇALVES, 2015).

Originalmente, as análises de especiação eram utilizadas em estudos para avaliar contaminação da água, do solo e de sementes. Contudo, o desenvolvimento de novas técnicas analíticas tem beneficiado cada vez mais a disseminação de conhecimento em áreas como a da saúde e a da ciência dos alimentos, com o emprego crescente em amostras biológicas, dentre as quais, o leite humano.

Em 2004, Remy et al. utilizaram a cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) associada ao ICP-MS para realizar a especiação e estabelecer padrões de leitura para a associação de micronutrientes a biomoléculas em leite humano. A metodologia foi utilizada por Fernández-Sánchez, et al., (2012) para comparar a especiação de ferro no leite de mulheres de parto prematuro e em fórmulas industrializadas. Em 2016, Fernández-Menéndez, et al. utilizaram o ICP-MS para determinar o teor de zinco no leite e realizar a especiação do mineral no leite humano e em fórmulas industrializadas. Este último estudo contou com a participação da equipe do Professor Doutor Ricardo Erthal Santelli, do Laboratório de Desenvolvimento Analítico – LaDA, do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FERNÁNDEZ-MENÉNDEZ et al., 2016).

3 JUSTIFICATIVA

Métodos analíticos comuns não permitem dosar com exatidão os elementos traço, presentes em baixas quantidades no leite humano. O emprego de análises de especiação química com utilização da técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, tem gerado novos conhecimentos na área da saúde sobre a composição química de micronutrientes e sua associação a biomoléculas no leite humano.

Em virtude da escassez de dados nacionais sobre o emprego de técnicas modernas de análise química de especiação de micronutrientes no leite humano cru, o estudo é de relevância, pois poderá identificar e quantificar associações de ferro, de cobre, de zinco e de iodo com biomoléculas presentes no leite de mulheres brasileiras, apontando a biodisponibilidade destes minerais para atender à demanda nutricional, imunológica e antioxidante do prematuro.

Os resultados obtidos poderão contribuir para modificar a atual visão sobre a qualidade de ferro, de cobre, de zinco e de iodo no leite humano, essencialmente apoiada no aspecto quantitativo, subsidiando a abordagem qualitativa acerca destes micronutrientes e enriquecendo a discussão sobre a composição nutricional do leite humano.

Ainda, a aplicabilidade prática do conhecimento atualizado gerado neste trabalho, poderá contribuir para fortalecer o uso do leite humano como primeira opção na abordagem nutricional do prematuro, bem como abrir campo para a realização de mais estudos nesta área.

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo Geral

Analisar a biodisponibilidade de ferro, de cobre, de zinco e de iodo no leite cru de puérperas adultas de parto pré-termo e a termo nas fases de colostro, leite de transição e leite maduro, por meio de análise de especiação química com utilização da técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.

3.1.2 Objetivos Específicos

Descrever as características sócio-demográficas, clínicas e da assistência pré-natal das puérperas integrantes do estudo.

Quantificar os teores de ferro, de cobre, de zinco e de iodo no leite cru de puérperas adultas de parto pré-termo e a termo nas fases de colostro, leite de transição e leite maduro.

Identificar, em amostras de leite humano cru, a especiação de ferro, de cobre, de zinco e de iodo e a presença de biomoléculas associadas a estes elementos de interesse.

Utilizar o conhecimento atualizado sobre a composição química de micronutrientes e biomoléculas associadas, para desenvolver um projeto aplicativo com o intuito de promover a sensibilização dos profissionais da Unidade de Neonatologia, com vistas à ampliação do uso do leite materno na abordagem nutricional do prematuro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo do tipo exploratório com amostra por julgamento, com um n de 30 amostras de leite de mulheres que tiveram partos a termo ou pré-termo na Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no período de 2015-2016 e que atenderam aos critérios de inclusão determinados no estudo.

Os critérios de inclusão foram: mulheres em aleitamento materno exclusivo e em livre demanda, ou que estavam realizando a ordenha no Banco de Leite, para posterior distribuição aos seus próprios lactentes internados na Unidade de Neonatologia, atendidas no parto/puerpério na maternidade estudada, adultas (idade cronológica ≥ 20 anos), de gestação de feto único, sem doenças crônicas, incluindo infecção por HIV.

Como critérios de exclusão, estipularam-se: o uso de medicamentos incompatíveis com a amamentação, segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2010), e as intercorrências da mama lactante, tais como ingurgitamento mamário, fissura ou mastite.

4.1 Coleta das Amostras

As puérperas foram captadas nos seguintes setores da maternidade: Alojamento Conjunto, Banco de Leite, alojamento canguru e unidade de terapia intensiva neonatal. Aquelas que concordaram em participar do estudo foram esclarecidas quanto aos procedimentos da ordenha, que foi realizada no Alojamento Conjunto ou no Banco de Leite.

Foram coletados dados obstétricos, características sócio-demográficas, clínicas e da assistência pré-natal, por meio de entrevista face a face padronizada e consulta aos prontuários das puérperas. A coleta de dados foi realizada por equipe treinada e supervisionada, constituída por nutricionista, lactarista, e bolsistas de iniciação científica que atuam na maternidade.

Os parâmetros apresentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária na Resolução da Diretoria Colegiada RDC 171 (BRASIL, 2006) e no manual técnico para bancos de leite humano (BRASIL, 2008), foram adotados para a classificação do tempo de maturação do leite, o tipo de parto segundo a idade gestacional e a paramentação necessária para a realização da coleta das amostras, a saber:

- classificação do tempo de maturação do leite:

- colostro - menos de 7 dias pós-parto

- leite de transição - 7 a 14 dias pós-parto
- leite maduro - > 14 dias pós-parto
 - classificação do tipo de parto segundo a idade gestacional:
- parto a termo - idade gestacional ao parto segundo a ultrassonografia >37 semanas de gestação
- parto pré-termo - idade gestacional ao parto segundo a ultrassonografia ≤37 semanas de gestação

Paramentação: jaleco, touca, máscara e luvas, todos descartáveis

Em frasco de polipropileno estéril, disponibilizado pelo Banco de Leite, as amostras foram coletadas e manipuladas segundo metodologia preconizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária no manual técnico para bancos de leite humano (BRASIL, 2008). Ao término da coleta, o frasco foi tampado, identificado e congelado em freezer a -5°C , disponível no Banco de Leite, onde permaneceu por no máximo 7 dias. A coleta das amostras de colostro, de leite de transição e de leite maduro das puérperas que tiveram o parto a termo foi realizada no alojamento conjunto, tendo sido transportadas em caixa isotérmica com gelo reciclável até o local de armazenamento, no banco de leite. Já as amostras de colostro, de leite de transição e de leite maduro das puérperas que tiveram o parto prematuro foram coletadas no banco de leite.

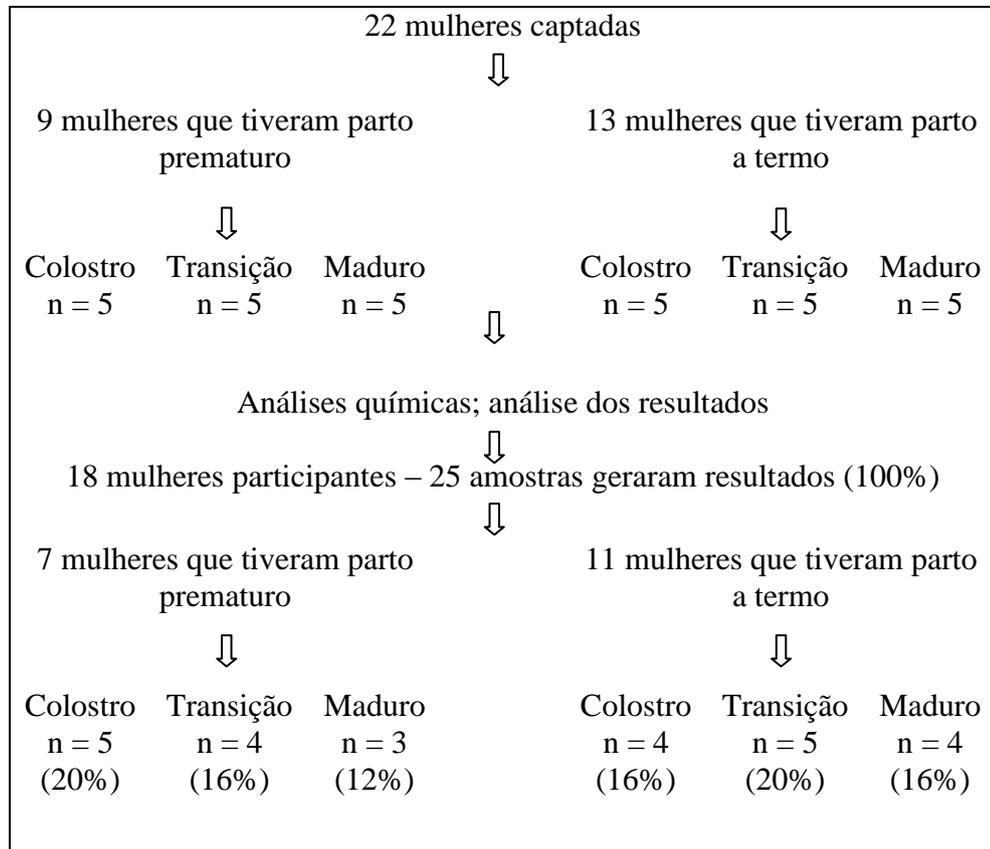
Para a realização deste estudo, foram coletadas trinta (30) amostras de leite humano, cedidas por vinte e dois (22) participantes. Algumas mulheres forneceram mais de uma amostra, doando seu leite em diferentes estágios de maturação.

As participantes foram divididas em dois grupos: mulheres que tiveram o parto prematuro ($n = 9$) e mulheres que tiveram o parto a termo ($n = 13$). Em cada grupo, foram coletadas 5 amostras de colostro, 5 amostras de leite de transição e 5 amostras de leite maduro, cada qual com 5ml de volume.

Das 30 amostras coletadas, 25 (83,3%) geraram resultados, ocorrendo perda de 5 amostras, cedidas por 4 mulheres, sendo 4 por volume insuficiente e 1 descartada por ser *outlier*, ou seja, por apresentar valores sem plausibilidade biológica, excepcionalmente elevados. Portanto, os resultados apresentados correspondem ao n final de 25 amostras, cedidas por 18 mulheres participantes.

O quadro 1 ilustra a distribuição das amostras para análise:

Quadro 1– Fluxograma de distribuição das amostras para análise, segundo estágio de maturação do leite humano



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

4.2 Análise de Especação Química

Semanalmente, as amostras de leite foram transportadas sob congelamento (ANVISA, 2006) ao Laboratório de Desenvolvimento Analítico – LaDA, do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, para realização das análises químicas. Após o recebimento no LaDA, foram imediatamente descongeladas sob refrigeração e separadas em alíquotas de 2mL. Em seguida, as alíquotas foram submetidas a ultracentrifugação sob refrigeração a 15000 x g e 4°C, com a finalidade de separar o soro da gordura e das caseínas. Para a obtenção do soro do leite, foi utilizada ultracentrífuga refrigerada Hettich, modelo Mikro 220R (Andreas Hettich 145 GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemanha).

Para a determinação dos teores totais, as amostras foram submetidas à digestão ácida com mineralização em forno de microondas, para eliminação da parte orgânica, a fim de evitar perda de precisão e de sensibilidade na leitura da parte mineral. Posteriormente, foram analisadas pela técnica de Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS).

Para a especiação, foi adotada metodologia desenvolvida por Remy et al. (2004), com realização de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), para separação das proteínas do leite, acoplada em linha ao ICP-MS. Para interpretação dos resultados, foram adotadas as faixas de separação das proteínas segundo o peso molecular, conforme metodologia citada:

- >600 – 160 KDa: faixa onde encontram-se as imunoglobulinas
- 90 – 70 KDa: faixa onde encontram-se a lactoferrina e glutatonas
- 40 – 30 KDa: faixa onde encontram-se resíduo de caseínas e a superóxido dismutase
- 20 – 10 KDa: faixa onde encontram-se a lisozima e a glutatona oxidase
- <10 KDa: faixa na qual o mineral encontra-se na sua forma inorgânica

A cromatografia foi realizada com a utilização do HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 140 (Amersham Biosciences), equipado com um loop de 50µL e um sistema de filtração. Para detecção molecular, foi utilizado o detector UV-Vis 141. A coluna de separação cromatográfica foi a de 142upx™ 200 Inccase.

Para a determinação dos totais e para a análise de especiação, o equipamento utilizado foi o modelo quadrupolo ICP-MS Thermo Scientific 131 iCAP Qc (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com software operacional Qtegra (versão 1.5.1189.1) para aquisição dos dados (Figura 2). Neste aparelho, as amostras foram injetadas em um sistema de introdução constituído de um nebulizador PFA-ST concêntrico de microfluxo 134, com câmara de pulverização ciclônica de quartzo deflector 135, refrigerada a 4°C.

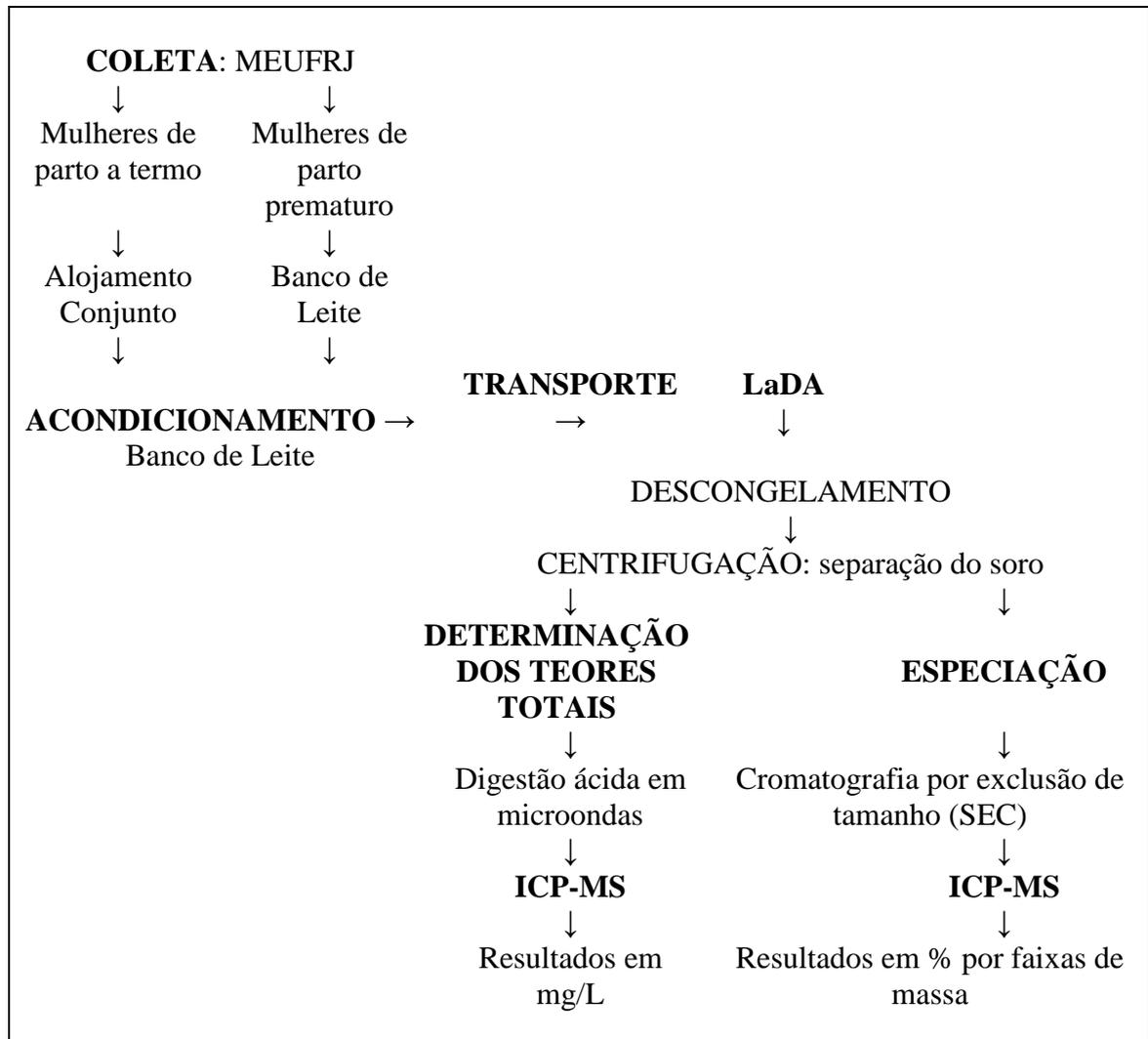
Figura 2 –HPLC (High Performance Liquid Chromatography) acoplado ao ICP-MS Thermo Scientific 131 iCAP Qc (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) – LaDA, UFRJ



Fonte: Elaborado pela autora, 2016

O quadro 2 resume o fluxo de análise das amostras de leite humano:

Quadro 2 – Fluxograma de análise de amostras de leite humano



Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Legenda: MEUFRJ: Maternidade Escola da UFRJ; LaDA: Laboratório de Desenvolvimento Analítico – Instituto de Química da UFRJ; ICP-MS: cromatografia de massa com plasma indutivamente acoplado

4.3 Questões Éticas

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Maternidade Escola da UFRJ em 19 de Dezembro de 2014 (Parecer 923.381). Todas as participantes foram esclarecidas quanto aos procedimentos empregados no estudo, e as que concordaram em participar, foram incluídas após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todas as participantes receberam uma via do TCLE.

Os riscos relacionados à participação das puérperas no estudo foram mínimos, tendo em vista que todos os procedimentos para a coleta das amostras de leite humano são padronizados e recomendados internacionalmente pela Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (rBLH-Br) (ANVISA, 2006, 2008), e adotados rotineiramente no Banco de Leite da maternidade estudada, a qual integra a referida rede. Todo o processo de ordenha manual foi realizado pela nutricionista responsável pelo banco de leite ou pela lactarista atuante na sala de ordenha do setor, que orientaram e apoiaram a nutriz em todas as etapas da coleta, visando minimizar a chance de ocorrência de erros durante o procedimento, com possível surgimento de dor ou marcas causadas pelo atrito das mãos. Além disso, a coleta da amostra de leite ocorreu de forma a assegurar que não houvesse interferência no processo de aleitamento materno e nem de extração do volume de leite oferecido ao lactente.

Os pesquisadores garantiram o sigilo acerca dos dados obtidos dos prontuários maternos, que os mesmos seriam utilizados apenas para a caracterização da amostra e asseguraram que os resultados seriam divulgados em conjunto, não permitindo a identificação das puérperas.

4.4 Análise dos Resultados

Os resultados obtidos das análises químicas foram comparados em relação aos teores totais dos micronutrientes inorgânicos, e em relação às biomoléculas a eles associadas, por meio de medidas de frequência e de dispersão (médias, valores máximos e mínimos, medianas e desvio-padrão). O pacote estatístico utilizado foi o SPSS versão 21.

5 RESULTADOS

As puérperas que integraram o grupo de parto prematuro apresentaram idade média de 30,86 anos (22 – 43 anos), e as integrantes do grupo de parto a termo apresentaram idade média de 26,91 anos (21 – 39 anos). As características sócio-demográficas, da assistência pré-natal e do parto, pertinentes às puérperas integrantes do estudo estão ilustradas na tabela 1.

Os dois grupos foram formados por maioria cuja cor da pele era negra ou parda, que cursou até o ensino médio e fez pré-natal fora da Maternidade Escola. No grupo de puérperas de parto prematuro, 57,1% ($n=4$) realizaram 7 ou mais consultas ao longo do pré-natal, e no grupo de puérperas de parto a termo, foram 72,7% ($n=8$). O pré-natal foi iniciado precocemente, antes da 14ª semana de gestação, para 57,1% ($n=4$) das mulheres que tiveram o parto prematuro e para 54,5% ($n=6$) daquelas cujo parto foi a termo. Entre as puérperas que tiveram o parto prematuro, observamos que a maioria (57,1%) iniciou o pré-natal com adequado estado nutricional, fez uso associado de sulfato ferroso com ácido fólico, deu à luz seu segundo filho e apresentava histórico de prematuridade. No grupo das puérperas que tiveram o parto a termo, 36,4% ($n=4$) encontravam-se com sobrepeso ao iniciar o pré-natal, 45,5% ($n=5$) fizeram suplementação com sulfato ferroso e 45,5% ($n=5$) deram à luz seu primeiro filho.

Dentre as mulheres que tiveram o parto prematuro, 100% o fizeram pela via vaginal, após um intervalo inferior a 2 anos da ocorrência do parto anterior (71,4%). A via vaginal também prevaleceu no grupo de mulheres de parto a termo (81,8%), no qual o intervalo interpartal foi ≥ 2 anos em 45,5% dos casos. A média de peso ao nascimento entre os recém-nascidos de parto prematuro foi de 1700,00g, ao passo que entre os nascidos de termo foi de 3445,45g.

Na tabela 2 observamos que no grupo de puérperas de parto prematuro os valores médios (mg/L) para ferro, cobre, zinco e iodo foram: 0,9967; 0,5058; 4,4158 e 0,4575. No grupo de puérperas de parto a termo, os valores médios (mg/L) para ferro, cobre, zinco e iodo foram: 0,7369; 0,2338; 2,9062 e 0,2685.

Do total de 12 amostras de leite cru de puérperas que tiveram o parto prematuro, 41,7% eram colostro, 33,3% eram leite de transição e 25% eram leite maduro. Já as 13 amostras de leite cru provenientes de puérperas que tiveram o parto a termo ficaram assim estratificadas: 30,8% colostro, 38,5% leite de transição e 30,8% maduro.

A sequência de tabelas, de 3 a 6, descreve a especificação dos elementos ferro, cobre, zinco e iodo nas amostras analisadas, por meio de distribuição percentual das associações

destes minerais com biomoléculas presentes nas faixas de diferentes pesos moleculares. À exceção do iodo, os demais micronutrientes apresentam como principais espécies a associação com biomoléculas dispersas na maior faixa de massa: >600 – 160 KDa.

Na tabela 3, ao analisarmos a especiação do ferro, observamos que entre as amostras do leite proveniente das puérperas que tiveram o parto prematuro, a associação com as proteínas da faixa de 90 – 70 KDa foi a segunda espécie prevalente no colostro (57,62%) e no leite maduro (68,73%). É nesta faixa de massa que encontra-se a lactoferrina. Já no leite de transição, a faixa de 20 – 10 KDa foi a segunda prevalente na formação de espécies do ferro: 10,82%. Na faixa de menor peso molecular (<10 KDa), não foi encontrada formação de espécie do ferro nas amostras do leite das puérperas de parto prematuro, independente da fase de maturação. No grupo de mulheres que tiveram o parto a termo, a faixa com segundo maior percentual de formação de espécies foi a de peso molecular de 20 - 10 KDa, sendo 12,10% no colostro e 9,08% no leite de transição, ao passo que no leite maduro, 17,12% das associações do ferro com biomoléculas foram registradas na faixa de peso molecular 90 - 70 KDa.

A especiação do cobre é apresentada na tabela 4. Entre as puérperas que tiveram o parto prematuro, observou-se que, independente da fase de maturação do leite, as principais distribuições de espécie do cobre dão-se nas faixas de maior peso molecular, onde o micronutriente faz associações com biomoléculas com ação protetora e antioxidante. No caso da associação às imunoglobulinas, os percentuais vão aumentando conforme o leite vai maturando, e em todas as fases foram superiores aos percentuais encontrados no leite das puérperas que tiveram o parto a termo. Foi observado o aumento do percentual de associações do cobre com biomoléculas na faixa 90 - 70 KDa, e diminuição do percentual de associações na faixa de 20 – 10 KDa no leite maduro das puérperas de parto a termo.

A tabela 5 apresenta a especiação do zinco nas amostras analisadas neste estudo. Entre as puérperas de parto prematuro, foi observada a formação de espécies nas faixas de 20 – 10 KDa e de 40 – 30 KDa, em percentuais superiores aos detectados no grupo das mulheres de parto a termo. Já as faixas de massa de 90 – 70 KDa e <10 KDa foram as que menos apresentaram associações entre o zinco e suas biomoléculas.

Com base nos resultados apresentados na tabela 6, percebe-se que, independente da fase de maturação ou do tempo de gestação, nas amostras analisadas neste estudo, o iodo apresentou-se marcadamente sob a espécie considerada inorgânica, ou seja, associado a proteínas de baixo peso molecular. Apenas um pequeno percentual do micronutriente apresentou-se associado a proteínas de grande peso molecular. Nas demais faixas de massa, não foi observada a formação de espécie.

Tabela 1 – Caracterização das puérperas, segundo variáveis sócio-demográficas e obstétricas
(Maternidade Escola/UFRJ, Rio de Janeiro, 2015-2016)

Variável		Mulheres de parto prematuro (n=7)	Mulheres de parto a termo (n=11)
Nível de instrução	Até ensino médio incompleto	28,6%	27,3%
	Ensino médio	42,9%	54,5%
	Ensino superior incompleto	14,3%	---
	Ensino superior	14,3%	18,2%
Ocupação	Trabalha	42,9%	54,5%
	Não trabalha	57,1%	45,5%
Cor da pele	Branças	28,6%	45,5%
	Negras ou pardas	71,4%	54,5%
Fez pré-natal	Sim	100%	90,9%
	Não	---	9,1%
Unidade onde fez o pré-natal	Maternidade Escola da UFRJ	42,9%	27,3%
	Fora da Maternidade Escola da UFRJ	57,1%	63,6%
	Não fez pré-natal	---	9,1%
Intervalo interpartal	≥2 anos	14,3%	45,5%
	<2 anos	71,4%	18,2%
Idade gestacional na data do parto	28s – 30s6d	14,3%	---
	31s – 33s6d	42,9%	---
	34s – 36s6d	42,9%	---
	37s – 38s6d	---	36,4%
	39s – 40s6d	---	63,6%

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Tabela 2 –Caracterização da amostra, segundo níveis de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e iodo (I) (Maternidade Escola/UFRJ, Rio de Janeiro, 2015-2016)

Amostra	Micronutriente (mg/L)	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Leite de mulheres de parto prematuro (n = 12)	<i>Fe</i>	0,9967	1,29010	0,21	4,95
	<i>Cu</i>	0,5058	0,25232	0,29	1,22
	<i>Zn</i>	4,4158	3,07178	1,70	12,92
	<i>I</i>	0,4575	0,27333	0,17	1,22
Leite de mulheres de parto a termo (n =13)	<i>Fe</i>	0,7369	1,16471	0,10	4,56
	<i>Cu</i>	0,2338	0,14128	0,02	0,47
	<i>Zn</i>	2,9062	3,21316	0,18	10,89
	<i>I</i>	0,2685	0,18018	0,04	0,68

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Tabela 3 – Especificação de ferro em amostras de leite humano cru segundo distribuição por faixas de peso molecular (Maternidade Escola/UFRJ, Rio de Janeiro, 2015-2016)

Amostra	Faixas de massa (KDa)	Média (%)	Mediana (%)	Desvio padrão (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
Colostro de mulheres de parto prematuro (n = 5)	>600 - 160	57,620	58,000	5,6901	48,7	63,8
	90 - 70	28,060	27,700	5,5931	22,1	37,0
	40 - 30	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	14,320	14,200	1,2276	13,1	16,2
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Leite de transição de mulheres de parto prematuro (n = 4)	>600 - 160	81,175	80,200	3,9677	77,5	86,8
	90 - 70	5,400	5,650	1,9339	2,9	7,4
	40 - 30	2,650	0,000	5,3000	0,0	10,6
	20 - 10	10,825	12,650	7,6448	0,0	18,0
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Leite maduro de mulheres de parto prematuro (n = 3)	>600 - 160	68,733	63,700	17,6953	54,1	88,4
	90 - 70	17,400	19,800	11,8832	4,5	27,9
	40 - 30	5,400	0,000	9,3531	0,0	16,2
	20 - 10	8,333	6,700	9,2587	0,0	18,3
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Colostro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	71,375	76,500	10,9296	55,0	77,5
	90 - 70	10,050	8,750	7,7934	2,0	20,7
	40 - 30	1,825	0,000	3,6500	0,0	7,3
	20 - 10	12,100	13,900	8,6768	0,0	20,6
	<10	3,625	0,000	7,2500	0,0	14,5
Leite de transição de mulheres de parto a termo (n = 5)	>600 - 160	75,540	71,100	7,1210	69,3	83,7
	90 - 70	6,700	5,200	7,3851	0,0	16,9
	40 - 30	8,580	3,500	10,5798	0,0	23,4
	20 - 10	9,080	12,400	8,7182	0,0	19,5
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Leite de maduro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	67,350	70,300	14,9946	47,7	81,1
	90 - 70	17,125	16,400	10,7602	5,7	30,0
	40 - 30	4,525	0,000	9,0500	0,0	18,1
	20 - 10	11,525	11,600	9,8253	0,0	22,9
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Tabela 4 – Especificação de cobre em amostras de leite humano cru segundo distribuição por faixas de peso molecular (Maternidade Escola/UFRJ, Rio de Janeiro, 2015-2016)

Amostra	Faixas de massa (KDa)	Média (%)	Mediana (%)	Desvio padrão (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
Colostro de mulheres de parto prematuro (n = 5)	>600 - 160	72,320	69,000	7,8452	67,2	86,1
	90 - 70	9,960	8,400	5,1091	5,7	18,8
	40 - 30	9,900	9,600	3,1953	6,2	14,8
	20 - 10	3,480	5,3000	3,1933	0,0	6,2
	<10	4,860	5,900	4,6414	0,0	9,5
Leite de transição de mulheres de parto prematuro (n = 4)	>600 - 160	76,100	79,000	9,4509	62,8	83,6
	90 - 70	11,475	7,650	13,2960	0,0	30,6
	40 - 30	1,950	0,000	3,9000	0,0	7,8
	20 - 10	4,025	3,250	4,8169	0,0	9,6
	<10	5,225	5,450	1,5019	3,4	6,6
Leite maduro de mulheres de parto prematuro (n = 3)	>600 - 160	85,333	84,700	4,5829	81,1	90,2
	90 - 70	2,699	0,000	3,8682	0,0	6,7
	40 - 30	2,400	0,000	4,1569	0,0	7,2
	20 - 10	5,433	7,700	4,7269	0,0	8,6
	<10	5,400	4,800	1,2166	4,6	6,8
Colostro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	58,825	57,150	22,4648	35,2	85,8
	90 - 70	21,625	22,150	12,8661	7,4	34,8
	40 - 30	5,875	5,050	6,9163	0,0	13,4
	20 - 10	13,675	10,050	9,3361	7,1	27,5
	<10	2,000	0,000	4,0000	0,0	8,0
Leite de transição de mulheres de parto a termo (n = 5)	>600 - 160	33,260	37,300	8,9265	18,5	40,0
	90 - 70	40,760	44,900	10,1628	28,2	50,8
	40 - 30	12,700	10,800	10,4305	0,0	25,3
	20 - 10	9,460	7,700	2,8945	7,0	13,6
	<10	3,720	3,300	1,6991	2,0	6,2
Leite de maduro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	53,100	49,800	22,7839	32,6	80,2
	90 - 70	31,725	34,600	29,4199	0,0	57,7
	40 - 30	4,650	0,000	9,3000	0,0	18,6
	20 - 10	7,425	8,600	5,6323	0,0	12,5
	<10	2,850	0,000	5,7000	0,0	11,4

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Tabela 5 – Especificação de zinco em amostras de leite humano cru segundo distribuição por faixas de peso molecular (Maternidade Escola/UFRJ, Rio de Janeiro, 2015-2016)

Amostra	Faixas de massa (KDa)	Média (%)	Mediana (%)	Desvio padrão (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
Colostro de mulheres de parto prematuro (n = 5)	>600 - 160	86,500	85,100	5,2745	80,1	94,1
	90 - 70	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	5,340	0,000	7,3429	0,0	14,3
	20 - 10	8,440	6,200	9,1262	0,0	19,2
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Leite de transição de mulheres de parto prematuro (n = 4)	>600 - 160	62,800	62,300	10,3508	51,9	74,7
	90 - 70	1,825	0,000	3,6500	0,0	7,3
	40 - 30	8,050	0,000	16,1000	0,0	32,2
	20 - 10	26,550	31,300	19,3894	0,0	43,6
	<10	0,375	0,000	0,7500	0,0	1,5
Leite maduro de mulheres de parto prematuro (n = 3)	>600 - 160	71,900	73,800	8,6087	62,5	79,4
	90 - 70	2,633	0,000	4,5611	0,0	7,9
	40 - 30	8,733	0,000	15,1266	0,0	26,2
	20 - 10	16,267	20,900	14,5156	0,0	27,9
	<10	0,833	0,000	1,4434	0,0	2,5
Colostro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	88,525	86,600	7,8987	81,7	99,2
	90 - 70	0,775	0,000	1,5500	0,0	3,1
	40 - 30	10,025	11,100	7,6882	0,0	17,9
	20 - 10	0,650	0,000	1,3000	0,0	2,6
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Leite de transição de mulheres de parto a termo (n = 5)	>600 - 160	86,140	89,200	5,7344	76,5	90,1
	90 - 70	2,540	3,000	2,5294	0,0	5,8
	40 - 30	4,140	0,000	9,2573	0,0	20,7
	20 - 10	6,760	8,100	4,4320	0,0	10,5
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Leite de maduro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	76,450	81,900	21,1253	47,5	94,5
	90 - 70	0,650	0,000	1,3000	0,0	2,6
	40 - 30	5,525	0,000	11,0500	0,0	22,1
	20 - 10	17,625	7,900	25,0856	0,0	54,7
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Tabela 6 – Especificação de iodo em amostras de leite humano cru segundo distribuição por faixas de peso molecular (Maternidade Escola/UFRJ, Rio de Janeiro, 2015-2016)

Amostra	Faixas de massa (KDa)	Média (%)	Mediana (%)	Desvio padrão (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
Colostro de mulheres de parto prematuro (n = 5)	>600 - 160	5,560	4,4881	0,0000	0,0	11,2
	90 - 70	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	<10	91,720	97,100	11,5394	73,3	100,6
Leite de transição de mulheres de parto prematuro (n = 4)	>600 - 160	3,275	4,050	2,2470	0,0	5,0
	90 - 70	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	<10	96,000	98,000	5,4772	88,0	100,0
Leite maduro de mulheres de parto prematuro (n = 3)	>600 - 160	3,900	2,500	4,7571	0,0	9,2
	90 - 70	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	<10	96,733	99,600	5,3154	90,6	100,0
Colostro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	2,375	0,250	4,4230	0,0	9,0
	90 - 70	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	<10	96,875	97,600	3,7977	92,3	100,0
Leite de transição de mulheres de parto a termo (n = 5)	>600 - 160	4,780	2,700	5,4815	0,0	11,7
	90 - 70	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	<10	87,220	100,000	18,9468	60,2	101,7
Leite de maduro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	3,925	4,800	2,7657	0,0	6,1
	90 - 70	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	<10	88,850	90,600	12,5152	74,2	100,0

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

6 DISCUSSÃO

Para determinação dos teores de micronutrientes investigados neste estudo, utilizou-se o ICP-MS para analisar 25 amostras de leite humano cru. De acordo com a tabela 2, no grupo de puérperas que tiveram o parto prematuro foram observados teores médios totais de micronutrientes superiores aqueles encontrados no grupo de puérperas de parto a termo.

Andrade, et al., (2014) em estudo conduzido em Ribeirão Preto, utilizou o ICP-MS para dosar micronutrientes, dentre eles, ferro, cobre e zinco. Foram analisadas 70 amostras coletadas de mulheres entre 16 e 39 anos, de parto a termo, cujos filhos tinham idade <6 meses e encontravam-se em aleitamento materno exclusivo (ANDRADE et al., 2014). Ao compararmos nossos achados com os de Ribeirão Preto, verificamos que, à exceção do ferro, todos os outros valores estavam aumentados, tanto no grupo de mulheres de parto prematuro quanto no de parto a termo. Os valores médios encontrados por Andrade, et al., (2014) foram: 2,65mg/L para ferro, 0,37mg/L para cobre e 2,50mg/L para zinco.

Em estudo conduzido na Austrália, por Mohd-Taufeck et al. (2016), doze (12) amostras de leite humano foram submetidas ao ICP-MS para realização de dosagem de micronutrientes, dentre os quais encontravam-se ferro, zinco, cobre e iodo. Os valores médios encontrados foram 48µg/L para ferro, 230µg/L para cobre, 1452µg/L para zinco e 119µg/L para iodo (MOHD-TAUFECK et al., 2016). Ao convertermos nossos resultados para µg/L, para possibilitar a comparação com o estudo australiano, percebemos que todos os achados novamente encontram-se aumentados, tanto no leite das puérperas de parto prematuro quanto nas de parto a termo. A diferença entre os valores é bastante discrepante, especialmente com relação ao ferro. Em nosso estudo, os valores encontrados nas amostras de leite de mulheres que tiveram parto prematuro foram: 996,7µg/L ferro, 505,8µg/L cobre, 4415,8µg/L zinco e 457,5µg/L iodo. Já nas amostras de leite de mulheres que tiveram o parto a termo encontramos: 736,9µg/L ferro, 233,8µg/L cobre, 2906,2µg/L zinco e 268,5µg/L iodo.

A desigualdade de valores talvez possa ser atribuída ao desenho metodológico do estudo australiano para seleção da amostra: leite coletado em pool de doadoras, pasteurizado em banco de leite com modelo operacional diferente do aplicado pela Rede Global de Bancos de Leite Humano (rBLH). A diferença entre os dois modelos acarreta visões distintas do leite humano, que irão repercutir em diferentes formas de manipulação. Por trabalhar sob a ótica de um alimento funcional, os parâmetros adotados pela rBLH ao longo do processamento, armazenamento e distribuição do leite humano, preservam as particularidades de cada fase do leite (ANVISA, 2006; 2008), o que não ocorre com os outros modelos, que manipulam o leite

sob a ótica de secreção humana, o que contribui para perdas nutricionais e de imunobiológicos.

O peso médio de nascimento dos prematuros dados à luz pelas integrantes deste estudo foi de 1770g. Ao utilizarmos como referência as indicações da American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (ASPEN.) e da *European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN) para avaliarmos as recomendações nutricionais de ferro, de cobre, de zinco e de iodo, em $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$, observamos que o leite produzido atendia aos requerimentos destes micronutrientes, apresentando níveis adequados para os mesmos (FINCH, 2015).

A sequência de tabelas de 3 a 6 ilustra a especificação dos elementos de interesse deste estudo. Analisando os resultados obtidos, podemos observar que:

Especiação do ferro: conforme demonstrado, a principal espécie do ferro nas amostras estudadas foi a associação estabelecida com as imunoglobulinas, encontradas na faixa de maior peso molecular ($>600 - 160 \text{ KDa}$), tanto no leite das puérperas que tiveram o parto prematuro, quanto naquelas de parto a termo. De acordo com os resultados, pode-se observar que a quantidade total de ferro presente no leite humano, aliada ao perfil de dispersão na formação de espécies, evita que o meio fique saturado de ferro. A distribuição das espécies formadas pela associação do ferro com biomoléculas no leite humano, portanto, favorece a manutenção da capacidade bacteriostática da lactoferrina.

A lactoferrina apresenta papel de destaque entre os componentes do leite humano, devido à sua ação bacteriostática. Trata-se de uma proteína vinculada ao ferro, como demonstrado na especificação, que age na mucosa do prematuro, estimulando sua função imunológica e conferindo proteção contra bactérias, vírus e fungos, sendo que a maior concentração encontrada é no leite humano (CAMPOS; REPKA; FALCÃO, 2013).

Para que a ação bacteriostática da lactoferrina seja preservada, o meio não pode estar saturado de ferro, pois esta proteína tem por função quelar o micronutriente, preservando seu conteúdo e favorecendo sua biodisponibilidade no leite humano. Ao quelar o ferro, a lactoferrina desempenha outra função de proteção para o prematuro: impede que o micronutriente circule livre no sangue, tornando-o indisponível para a utilização pelas enterobactérias, inibindo o crescimento microbiano e diminuindo o risco de infecções do trato digestivo (QUEIROZ; ASSIS; RIBEIRO JÚNIOR, 2013).

Em revisão na base Cochrane encontrou-se o autor BROWN, et al. (2016), que concluiu dados sobre a fortificação do leite materno com multinutrientes eram limitados e não forneciam evidências consistentes de que a prática traz benefícios efetivos ao prematuro ao

médio e ao longo prazo, exceto um ligeiro aumento das taxas intra-hospitalares de crescimento. Nossos achados fortalecem a recomendação de autores encontrada na base Cochrane para o uso criterioso dos aditivos, especialmente aqueles que contêm ferro, devido ao risco de saturação do meio e prejuízo à ação bacteriostática da lactoferrina, conferindo perda de qualidade do leite materno e aumento do risco do prematuro para infecção (QUEIROZ; ASSIS; RIBEIRO JÚNIOR, 2013; JAKAITIS; DENNING, 2014; LÖNNERDAL, 2016).

Os resultados da especiação do ferro demonstraram que, nas amostras das puérperas de parto prematuro, conforme a maturação de colostro até a fase de leite maduro, há um aumento no percentual das associações do micronutriente com as imunoglobulinas, e diminuição do percentual de associações nas faixas onde encontramos a lactoferrina (90 – 70KDa) e a lisozima (20 – 10 KDa). Tal característica parece favorecer tanto a biodisponibilidade do ferro, por impedir sua circulação na forma inorgânica (livre) bem como a atuação sinérgica entre a lactoferrina e a lisozima, importante fator de defesa para o prematuro.

Nas amostras de leite maduro, o padrão de distribuição foi semelhante nos dois grupos; porém, nas amostras das puérperas de parto a termo, o percentual de associações foi menor na faixa das imunoglobulinas e maior na da lactoferrina, sugerindo sintonia com o estágio de desenvolvimento do lactente, no qual a necessidade de incorporação do micronutriente é maior que a de imunoproteção.

Assim como em nosso estudo, a associação a imunoglobulinas foi a principal espécie encontrada no desfecho apresentado por Fernández-Sánchez et al., (2012) em estudo publicado, no qual realizaram a especiação do ferro em amostras de leite de onze (11) puérperas de parto prematuro e 4 de parto a termo, em diferentes fases de maturação.

Especiação do cobre: à exceção do leite de transição das puérperas que tiveram o parto a termo, o percentual de distribuição do cobre foi maior nas associações com as imunoglobulinas, seguido pelas biomoléculas presentes na faixa de 90 – 70 KDa, onde é possível encontrarmos glutathione, enzima com importante papel na redução de agentes oxidantes. Portanto, a especiação do cobre no leite materno sugere uma vantagem adaptativa, pois através das associações que o micronutriente faz com as biomoléculas, parece contribuir para impactar positivamente nos processos imunológicos e antioxidantes no organismo do recém-nascido, especialmente na vigência da prematuridade.

Especiação do zinco: a associação às imunoglobulinas foi marcadamente a principal espécie apresentada pelo zinco, sendo que o percentual decai com o avanço da maturação,

tanto no leite das puérperas de parto prematuro quanto de parto a termo. Na faixa de 20 – 10KDa encontra-se a glutathione oxidase, e na faixa de 30 – 40KDa, a superóxido dismutase, que são importantes componentes do sistema antioxidante enzimático, e que são dependentes de zinco e de cobre para seu adequado desempenho (NOGUEIRA; BORGES; RAMALHO, 2010). Nossos achados sugerem que também para o zinco, o perfil de formação de espécies favorece a biodisponibilidade do micronutriente para ser incorporado aos processos imunológicos e antioxidantes, através de associações com imunoglobulinas, e proteínas na faixa da glutathione oxidase e da superóxido dismutase.

Fernández-Menéndez, et al., (2016) realizaram a especiação do zinco em amostras de leite de dezesseis (16) puérperas de parto a termo e de quinze (15) puérperas de parto pré-termo. A análise não apresentou diferenças entre os grupos, e assim como em nosso estudo, a principal espécie observada foi a associação do zinco com imunoglobulinas.

Em estudo conduzido por Remy et al. (2004) desenvolveram metodologia e padrões para a aferição de elementos traço no leite humano, em diferentes estágios de maturação. Para tanto, foi utilizado o soro do leite de mulheres que tiveram parto prematuro. Os tempos de maturação do leite estipulados para coleta das amostras foram colostro, 4º dia pós-parto, 14º dia pós-parto e 28º dia pós-parto, e foi realizada a coleta de 3 amostras individuais para cada fase. A análise foi multielementar, incluindo ferro, cobre, zinco e iodo.

Ao estabelecermos uma comparação entre nossos achados e os de Remy et al., (2004), podemos observar que:

Especiação do ferro: o estudo de 2004 encontrou o ferro associado principalmente às imunoglobulinas, seguido da associação a compostos de baixo peso molecular. Os autores destacaram ainda, no colostro, a ocorrência de associação com biomoléculas na faixa de 90 – 70 KDa, mais especificamente, 67 KDa, relacionado, provavelmente, à lactoferrina. Em nosso estudo, a maior associação do ferro foi detectada igualmente na faixa das imunoglobulinas. Contudo, no leite das puérperas de parto pré-termo, o percentual encontrado foi maior na fase madura do que na de colostro, em oposição ao resultado proveniente do leite das puérperas de parto a termo.

Ao contrário do estudo de Remy et al. (2004) no leite das mães prematuras, encontramos a segunda maior associação na faixa de massa na qual se detecta a lactoferrina.

- cobre: ao contrário do nosso estudo, foi observado um decréscimo nos percentuais da faixa de baixo peso molecular (< 10 KDa). No estudo de Remy et al. (2004), houve um aumento acentuado na faixa de alto peso molecular, e os autores acreditaram dever-se à IgA.

Em nosso estudo também foi observado aumento no percentual de associações na faixa das imunoglobulinas, conforme a maturação do leite das puérperas de parto pré-termo.

Zinco: o estudo pioneiro descreveu a especiação deste mineral como tendo sido similar em todas as fases do leite, sendo as principais espécies encontradas nas associações com biomoléculas pertencentes às faixas de alto e de baixo peso molecular, respectivamente. Em nossos achados, os principais percentuais de especiação do zinco foram as associações com biomoléculas nas faixas de alto peso molecular e na de 20 – 10 KDa, nesta ordem.

Iodo: os autores ressaltaram que no leite de mulheres que tiveram o parto prematuro, a distribuição do iodo é complexa, com registro de associações na faixa de alto peso molecular. De fato, nossos resultados demonstraram a ocorrência de pequenos percentuais de associação nesta mesma faixa. Contudo, a exemplo da equipe de St Remy (REMY et al., 2004), nossos achados apontam que a principal espécie do iodo no leite de puérperas de parto prematuro é a associação a frações não protéicas, de baixo peso molecular, com leve declínio desde colostro até leite maduro.

A análise de especiação evidenciou os padrões de associações de ferro, de cobre, de zinco e de iodo a biomoléculas presentes nas amostras de leite de puérperas de parto prematuro e de parto a termo que integraram este estudo. Por estarem associados às biomoléculas, estes micronutrientes apresentam maior biodisponibilidade, pois, não circulam de forma livre, evitando assim que a quantidade ingerida seja perdida ao longo do processo de digestão.

Os achados corroboram aqueles encontrados na literatura, tanto no que concerne aos valores quantitativos quanto aos qualitativos, e atualizam estudos que são clássicos.

Por meio do emprego da análise de especiação, foi possível demonstrar como as diversas associações de ferro, de cobre, de zinco e de iodo com biomoléculas favorecem a biodisponibilidade destes micronutrientes no leite humano e influenciam positivamente as defesas imunológicas e antioxidantes, especialmente no caso dos prematuros. Sob esta ótica, o estudo poderá colaborar para subsidiar a abordagem qualitativa acerca de micronutrientes e enriquecer a discussão sobre a composição nutricional do leite humano, sensibilizando os profissionais das unidades de neonatologia e as próprias instituições onde estão inseridas, a buscar mudanças nas práticas assistenciais, fortalecendo a participação materna como co-terapeuta na recuperação do prematuro.

Como limitação do estudo, apontamos o fato de o mesmo ter sido conduzido em uma única maternidade e o limitado tamanho amostral. Contudo, ressaltamos que a maternidade em questão é uma instituição pública e sua unidade de neonatologia é referência para

prematuros e recém-nascidos de risco. Com relação ao tamanho amostral, ressaltamos que o mesmo encontra-se em consonância com os estudos correspondentes encontrados na literatura.

Percebe-se que o grupo com menor percentual gerador de resultados foi o de leite maduro de puérperas de parto prematuro. Tal situação pode ser explicada pela dificuldade de acesso à amostra, uma vez que, nesta fase, na maioria dos casos, a mãe já recebeu a alta obstétrica e encontra-se em casa, regressando à unidade durante o dia para visitar seu bebê. O afastamento físico, por vezes intensificado pela falta de recursos financeiros para permitir visitas diárias, aliado ao cansaço da rotina de idas e vindas à maternidade, a ansiedade, o medo da perda, a tristeza de ter de voltar para a casa sem o seu bebê, são questões que permeiam a rotina diária das mães de prematuros, o que termina por deflagrar o decréscimo da produção de leite (SASSÁ et al., 2014).

Estudos futuros devem ser realizados com o emprego da cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) associada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para especificação de outros micronutrientes, como cálcio, fósforo e selênio.

Por fim, recomendamos o leite materno para a nutrição do recém-nascido a termo, pelas vantagens classicamente descritas na literatura e pela oferta de ferro, de cobre, de zinco e de iodo em quantidades adequadas e em espécies que favorecem sua biodisponibilidade, permitindo atender às demandas deste lactente.

Para recém-nascidos prematuros, recomendamos o uso do leite materno como recurso terapêutico para nutrição e adaptação ao meio extra-uterino, tendo em vista que o mesmo fornece ferro, cobre, zinco e iodo em quantidades adequadas e com biodisponibilidade ajustada às particularidades deste grupo, conferindo suporte à demanda nutricional destes micronutrientes e favorecendo os processos imunológicos e antioxidantes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo, de caráter inovador, utilizou espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para realizar a análise química da biodisponibilidade de ferro, de cobre, de zinco e de iodo, através da determinação de valores totais e da realização da especiação destes micronutrientes inorgânicos em amostras de leite cru de puérperas adultas de parto pré-termo e a termo, em diferentes fases de maturação. Os resultados demonstraram que os elementos estudados estão presentes em quantidades adequadas às necessidades nutricionais dos recém-nascidos a termo e prematuros, e em condições apropriadas para seu uso.

Quanto às características sócio-demográficas, clínicas e da assistência pré-natal, observou-se que tanto o grupo de puérperas de parto prematuro quanto o de parto a termo foram formados por maioria cuja cor da pele era negra ou parda, que cursou até o ensino médio e fez pré-natal fora da Maternidade Escola. Entre as puérperas que tiveram o parto prematuro, observamos que a maioria iniciou o pré-natal com adequado estado nutricional, fez uso associado de sulfato ferroso com ácido fólico, deu à luz seu segundo filho e apresentava histórico de prematuridade. No grupo das puérperas que tiveram o parto a termo, a maioria encontrava-se com sobrepeso ao iniciar o pré-natal, fez suplementação com sulfato ferroso e deu à luz seu primeiro filho.

Os padrões das associações evidenciaram que os micronutrientes estudados estão distribuídos acompanhando as necessidades imunológicas, antioxidantes e nutricionais do lactente, estando nos locais onde serão exigidos. Ao se apresentarem associados a biomoléculas, os elementos traço passam a integrar moléculas espécie-específicas do leite humano, elaboradas para o uso do receptor, segundo suas necessidades.

Os achados oferecem subsídios para demonstrar benefícios qualitativos da composição de micronutrientes, os quais são superiores aqueles meramente quantitativos das fórmulas industrializadas. Prematuros alimentados com leite artificial recebem teores aumentados de minerais; todavia, esta quantidade elevada é necessária para compensar sua menor biodisponibilidade. A especiação demonstrou a associação de ferro, de cobre, de zinco e de iodo a biomoléculas do sistema imunológico e do sistema antioxidante, a qual aumenta a biodisponibilidade destes micronutrientes no leite humano e favorece o seu aproveitamento

pelo recém-nascido. Por atender às necessidades quantitativas e qualitativas do prematuro, o leite humano apresenta qualidade superior ao produto industrializado.

Ao demonstrar a associação dos micronutrientes com biomoléculas do sistema imune e do sistema antioxidante, o estudo reforça conceitos que já se conhece quase que empiricamente, fornecendo novo embasamento para fortalecer o uso terapêutico do leite humano como primeira opção efetiva na abordagem nutricional do prematuro.

Trabalhar com leite humano cru tornou o estudo mais complexo, em função da dificuldade de acesso à amostra, especialmente no caso das mulheres que tiveram o parto prematuro, uma vez que seus filhos encontravam-se internados na Unidade de Neonatologia.

O Programa de Mestrado Profissional em Saúde Perinatal da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro confere aos seus egressos a possibilidade de analisar criticamente suas práticas cotidianas e propor soluções para transformá-las, aliando o conhecimento prático ao saber acadêmico. Sob esta ótica, o conhecimento adquirido ao longo da realização da dissertação acadêmica foi colocado em prática através da construção do projeto aplicativo intitulado “Sensibilização dos Profissionais da Unidade de Neonatologia: Conhecimento Atualizado sobre Composição Química de Micronutrientes e Biomoléculas Associadas para Ampliar o Uso do Leite Materno na Abordagem Nutricional do Prematuro”, visando fortalecer a assistência prestada aos prematuros internados na Unidade Neonatal da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O estudo desenvolvido está em sintonia com a filosofia inovadora da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro, instituição que visa não somente a qualidade da assistência prestada, mas também o desenvolvimento de práticas de caráter vanguardista no âmbito da Saúde Perinatal.

Por fim, em virtude da composição adequada e ajustada às demandas do lactente, aliada aos benefícios psíquicos e emocionais proporcionados pela amamentação, recomendamos a orientação da Organização Mundial da Saúde e do Ministério da Saúde: o uso do leite materno exclusivo até os seis meses e complementado até os dois anos ou mais.

Na vigência de prematuridade ou de situações de risco no pós-nascimento que requeiram internação em Unidade de Neonatologia, recomendamos o uso do leite materno como recurso terapêutico para nutrição e adaptação do recém-nascido ao meio extra-uterino, visando a diminuição do risco de infecções e a promoção da saúde nas diferentes etapas de sua vida.

Como continuidade, sugere-se a realização de mais estudos com emprego do ICP-MS nesta área, com ampliação do tamanho amostral, realização de investigações que possibilitem

correlações entre ingesta materna de micronutrientes e a correspondente especiação no leite e realização de especiação em leite processado, segundo o modelo praticado na Rede Global de Bancos de Leite Humano.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento de bancos de leite humano. Resolução n.171, de 4 de setembro de 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2006. Seção 1, p. 33.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Banco de leite humano**: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília: Anvisa, 2008. (Série Tecnologia em Serviços de Saúde)

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Perguntas e respostas sobre fórmulas infantis**: gerência de produtos especiais: gerência geral de alimentos. Brasília: Anvisa, 2014.

ALMEIDA, J.A.G. **Amamentação**: um híbrido natureza-cultura. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1999.

ALMEIDA, J.A.G.; NOVAK, F. R. Amamentação: um híbrido natureza-cultura. **Jornal de Pediatria**. v.80, n.5, p. s119-s125, 2004. Suplemento.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Breastfeeding and the use of human. **Pediatrics**. v.129, n.3, p.e827-e841, 2012.

ANDRADE, M.T.S., et al. Breast milk micronutrientes in Lactating Mothers from Ribeirão Preto (SP), Brazil. **Food and Nutrition Sciences**, v.5, 1196-1201; 2014.

ARPINI, L. S. B; ARPINI, A. F. Integração dos campos de saúde coletiva e alimentação e nutrição num contexto de promoção da saúde relacionado às doenças crônicas não transmissíveis. **Demetra**, v. 9, n. 2, p. 451-465, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.12957/dmetra.2014.8502>> Acesso em: 15 jan. 2016.

BALLARD, O.; MORROW, A. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatr Clin North Am.**, v.60, n.1, p. 49-74, 2013.

BALDAN, M. A; FARIAS, V. P; BÁCARO, S. D. Comparativo entre aleitamento materno exclusivo e outros tipos de leite no desenvolvimento imunológico de crianças de 0 a 12 meses. **Revista Funec Científica.**, v. 1, n. 1, 2013

BROWN, J. V. E., et al. Multi-nutrient fortification of human milk for preterm infants (review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n 5., 2016. Disponível em: 10.1002/14651858.CD000343.pub3.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Amamentação e uso de medicamentos e outras substâncias. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. 2 ed. Brasília:MS, 2010. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Atenção humanizada ao recém-nascido de baixo peso: método canguru**. 2. ed., 1. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. (Manual Técnico)

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da Criança: aleitamento materno e alimentação complementar**. Cadernos de Atenção Básica. 2 ed. Brasília, 2015. (Cadernos de Atenção Básica, 23) Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_crianca_aleitamento_materno_cab23.pdf> Acesso em: 13 de Março de 2016.

CAMPOS, L.F.; REPKA, J.C.D; FALCÃO, M.C. Effects of human milk fortifier with Iron on the bacteriostatic properties of breast milk. **J Pediatr**. v.89, p.394-399, 2013.

CAMPOS, R. O.; RAMOS, H. E. Nutrição de iodo na infância: análise do teor de iodo informado em fórmulas infantis para lactentes. **Rev. Ciênc. Med. Biol**; v,12, p. 454-459, 2013. Especial:

CASTELLOTE, C., et al. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature milk. **J Nutr.**, v.141, p. 1181-1187, 2011.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M. L., et al. Iron content and its speciation in human milk from mothers of preterm and full-term infants at early stages of lactation: a comparison with commercial infant milk formulas. **Microchemical Journal**, v.105, p.108-114, 2012.

FERNÁNDEZ- MENÉNDEZ, S. et al. Total zinc quantification by inductively coupled plasma-mass spectrometry and its speciation by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry in human Milk and commercial formulas: Importance in infant nutrition. **J. Chromatogr.**, v.146, p. 246-254, 2016.

FINCH, C.W. Review of trace mineral requirements for preterm infants: what are the current recommendations for clinical practice? **Nutrition in Clinical Practice.**, v.30, n. 1, p. 44-58, 2015.

GONÇALVES, R. M.; MELO, C. S. Aleitamento materno versus aleitamento artificial. *Estudos Goiânia*, v. 41, especial, p. 7-14, 2014. Disponível em: <https://seer.ucg.br/index.php/estudos/article/download/3804/2168>. Acesso em: 11 de Janeiro de 2016.

JAKAITIS, B. M.; DENNING, P. W. Human breast milk and the gastrointestinal innate immune system. *Clin Perinatol.*, v.41, n. 2, p. 423-435, 2014.

LÖNNERDAL, B. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *Am J Clin Nutr.*, v.99, p. 712S-717S, 2014. Suplemento.

LÖNNERDAL, B. Bioactive proteins in human milk: potential benefits for preterm infants. *Clin Perinatol*, v. 44, n. 1, p. 179-191, 2016.

MARTIN, C.R.; LING, P.; BLACKBURN, G. L. Review of infant feeding: key features of breast milk an infant formula. *Nutrients.*, v. 8, p. 279, 2016.

MELLO, E. D.; COELHO, J. C. Zinco: por que e quando suplementar? *I.J.N.*, v.4, n.2, p.38-43, 2011.

MOHD-TAUFECK, N. et al. The simultaneous analysis of eight essential trace elements in human milk by ICP-MS. *Food Anal Methods.*, v. 9, p.2068-2075, 2016.

MORGANO, M. A. et al. Composição mineral do leite de bancos de leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.25, n. 4, p. 819-824, 2005.

NASCIMENTO, R. S.; et al. Determination of trace elements in brazilian human milk by quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry and microwave – assisted digestion. *Atomic Spectroscopy.*, v. 29 n. 3, 2008.

NOGUEIRA, C.; BORGES, F.; RAMALHO, A. Micronutrientes com ação antioxidante em neonatos. *Rev Paul Pediatr.*, v.28, n. 4, p. 381-386, 2010.

OVEISI, M. R., et al. Human breast milk provides better antioxidant capacity than infant formula. *IJPR.* v. 9, n.4, 445-449; 2010.

PRENTICE, P. et al. Breast milk nutrient content and infancy growth. **Acta Paediatric**, v.105; 641-647; 2016.

QUEIROZ, V.A.O.; ASSIS, A.M.O.; RIBEIRO JÚNIOR, H.C. Efeito protetor da lactoferrina humana no trato gastrointestinal. **Rev Paul Pediatr.**, v.31, n.1, p.: 90-95, 2013.

REDE BRASILEIRA DE BANCO DE LEITE. Carta de Brasília 2015. Disponível em: http://www.redeblh.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?from_info_index=271&infoid=1020&sid=368#. Acesso em: 15 jan. 2016.

REIS, L.S.; GONÇALVES, E.C.B.A. Chemical speciation: an instrument for evaluation of mineral bioavailability. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.45, n.6, p.1126-1132, 2015.

SARNI, R. O. et al. Micronutrientes e sistema imunológico. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v.33, n. 1, p. 08-13, 2010.

SASSÁ, A. H. et al. Bebês pré-termo: aleitamento materno e evolução ponderal. **Rev Bras Enferm.**, v.67, n. 4, 594-600, 2014.

REMY, R. R., et al. Multi elemental distribution patterns in premature human milk whey and pre-term formula milk whey by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octopole reaction cell. **J. Anal. At. Spectrom.**, v.19, p. 1-8. 2004.

TRINDADE, C. J. Importância dos minerais no pré-termo extremo. **J. Ped.**, v. 81, n. 1, p. 43-51. 2005. Suplemento.

TURIN, C. G; OCHOA, T. J. The role of maternal breast milk in preventing infantile diarrhea in the developing world. **Curr Trop Med Rep.** v.1, n. 2, p.97-105, 2014.

WINIARSKA-MIECZAN, A. Cadmium, lead, copper and breast milk in Poland. **Biol Trace Elem Res.**, v.157, p. 36-44, 2014.

YANAGISAWA, H. Zinc deficiency and clinical practice – validity of zinc preparations. *yakugaku zasshi*. Japan: **The Pharmaceutical Society of Japan**, v.128, n. 3, p. 333-339, 2008.

ZHOU, J. et al. Human Milk Feeding as a Protective Factor for Retinopathy of Prematurity: A Meta-analysis. **Pediatrics**, v.136, n.6, p. e1576-e1586, 2015.

APÊNDICE A – Projeto Aplicativo



**Programa de Mestrado Profissional
em Saúde Perinatal da Maternidade Escola
da Universidade Federal do Rio de Janeiro**



VÂNIA DE OLIVEIRA TRINTA

**SENSIBILIZAÇÃO DOS PROFISSIONAIS DA UNIDADE DE NEONATOLOGIA:
CONHECIMENTO ATUALIZADO SOBRE COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE
MICRONUTRIENTES E BIOMOLÉCULAS ASSOCIADAS PARA AMPLIAR O USO
DO LEITE MATERNO NA ABORDAGEM NUTRICIONAL DO PREMATURO**

Projeto Aplicativo desenvolvido no Programa de Mestrado Profissional em Saúde Perinatal da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^o Dr. Joffre Amim Junior

**Rio de Janeiro
Julho - 2016**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	
1.2. OBJETIVOS.....	
1.2.1. Objetivos da Ação.....	
1.2.2. Ações Específicas.....	
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	
2.1. Leite Humano.....	
2.2. Fórmulas Industrializadas.....	
2.3. Importância dos Minerais na nutrição do Recém-nascido.....	
2.4. Importância do Conhecimento sobre a Especificação Química de um Elemento em Determinado Alimento.....	
2.5. Planejamento Estratégico Situacional.....	
3. ANÁLISE DE PROBLEMAS.....	
3.1. A Árvore de Problemas.....	
3.2. O Problema, O Plano, A Política e A Estratégia.....	
3.3. Árvore de Problemas do Projeto Aplicativo Proposto.....	
4. ATORES SOCIAIS.....	
4.1. Conceito.....	
4.2. Matriz de Identificação e Relevância dos Atores.....	
5. PLANO DE AÇÃO.....	
5.1. Apresentação das Operações.....	
5.2. Plano de Ação do Projeto Aplicativo Proposto.....	
5.3. Apresentação dos Recursos.....	
5.4. Matriz de Motivações.....	
5.5. Matriz de Recursos.....	
5.6. Matriz de Controle de Recursos.....	
5.7. Análise de Viabilidades.....	
5.8. Balanço de Viabilidades.....	
6. RESULTADOS ESPERADOS.....	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	

1 INTRODUÇÃO

A nutrição adequada é de extrema importância na atenção ao prematuro. A exemplo de carboidratos, proteínas e lipídios, é necessária a oferta adequada de micronutrientes, para dar suporte ao pleno desenvolvimento, à taxa de crescimento acelerado e à proteção contra infecções. O bebê nascido prematuramente apresenta risco aumentado para carências de vitaminas e minerais.

O leite materno é um alimento seguro, que confere nutrição e proteção ao recém-nascido. Além de atender aos requisitos nutricionais e imunológicos do bebê, é compatível ao desenvolvimento do trato gastrointestinal imaturo. A alimentação com leite humano respeita a programação metabólica inicial do indivíduo e promove impacto positivo na sua saúde, não apenas no início precoce da vida pós-natal, mas também a longo prazo, ou seja, na fase adulta. Tais benefícios tornam o leite materno a melhor opção de nutrição do lactente, especialmente nas situações de nascimento pré-termo.

Atualmente, com o avanço do emprego de técnicas modernas de análise química de especiação, é possível identificar e quantificar associações dos micronutrientes com biomoléculas, gerando novos conhecimentos sobre a composição química e a biodisponibilidade de minerais no leite humano. A disseminação deste conhecimento atualizado, junto aos profissionais que atuam na Unidade de Neonatologia, poderá contribuir para mudar a visão atual na utilização de fórmulas e aditivos no período precoce da vida pós-natal e impactar positivamente a preferência no momento da prescrição, fortalecendo o uso do leite materno como recurso terapêutico e primeira opção na abordagem nutricional do recém-nascido prematuro, bem como abrir campo para a realização de mais estudos nesta área.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como pergunta norteadora: “É possível diminuir o uso de fórmulas e aditivos na Unidade de Neonatologia, sensibilizando seus profissionais com conhecimento atualizado sobre a composição química do leite humano?”

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo da Ação

Utilizar o conhecimento atualizado sobre a composição química de micronutrientes e biomoléculas associadas, para sensibilizar os profissionais da Unidade de Neonatologia a ampliar o uso do leite materno na abordagem nutricional do prematuro.

1.2.2 Ações Específicas

- 1 – Realizar análise química do leite humano cru;
- 2 – Elaborar material informativo escrito a partir dos resultados da análise química;
- 3 – Divulgar o material e realizar a sensibilização dos profissionais da Unidade de Neonatologia;
- 4 – Avaliar a adesão dos profissionais da Unidade de Neonatologia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leite Humano

A nutrição adequada na etapa inicial da vida pós-natal é de suma importância, uma vez que influencia e programa a saúde da fase adulta. Nos primeiros seis meses de vida, a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) é a oferta exclusiva de leite materno, que por respeitar a imaturidade gastrointestinal do bebê, fortalecer seu sistema imune igualmente imaturo, bem como propiciar benefícios psicológicos e emocionais, apresenta-se como o alimento mais natural e seguro a ser utilizado neste período (BRASIL, 2008, 2014; BRASIL, 2010, 2013, 2015).

Para melhor atender às necessidades nutricionais e imunológicas do lactente ao longo do seu desenvolvimento, a composição do leite materno se modifica com o tempo, a partir do colostro, até atingir o estágio chamado de maduro, tendo uma ampla variação no volume produzido (BRASIL, 2008, p. 124). No colostro, observa-se um maior teor protéico e maior quantidade de imunoglobulinas, ao passo que o leite maduro fornece um maior aporte de gordura (BRASIL, 2015, p. 30).

Do ponto de vista nutricional, o papel dos micronutrientes presentes no leite humano merece mais estudos, quando comparado aos macronutrientes, e tem-se observado um interesse cada vez maior por esta temática, em virtude do seu impacto na saúde (FERNÁNDEZ-MENÉNDEZ et al., 2016, p. 246). Enquanto que a composição dos macronutrientes é amplamente discutida em termos tanto quantitativos quanto qualitativos, os micronutrientes normalmente são abordados unicamente em termos quantitativos, sob a ótica de padrões de recomendações de ingestão diária (St. REMY et al, 2004, p.1110).

O conteúdo de minerais do leite humano corresponde a cerca de 1/3 do existente no leite de vaca, o que, aliado ao menor teor de proteínas, o que é compatível ao ritmo de crescimento de nossa espécie, confere sincronia entre a carga de solutos da dieta e a imatura função renal do lactente (BALDAN, FARIAS e BÁCARO, 2013, p. 5; BRASIL, 2013, p. 90).

2.2 Fórmulas industrializadas

Fatores como o desenvolvimento da indústria de alimentos, a inserção da mulher no mercado de trabalho e o marketing abusivo em torno de sucedâneos do leite materno, foram tornando o desmame uma prática cada vez mais precoce e recorrente, com predomínio do aleitamento artificial (BRUNKEN, 2006 *apud* BALDAN, FARIAS e BÁCARO, 2013, p. 2; ALMEIDA e NOVAK, 2004, p. 124). Desta forma, observou-se um aumento alarmante das taxas de morbi-mortalidade infantil a partir da década de 1940, especialmente nos anos de 1970 (ALMEIDA, 1999). Este cenário fez florescer, a partir do início da década de 1980, a adoção de ações e políticas públicas em prol do aleitamento materno, destacando-se o Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (PNIAM), o grupo de apoio Amigas do Peito e a Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (RedeBLH),

As fórmulas infantis normalmente mais utilizadas são produtos à base de leite de vaca. Ao longo do processo industrial, este leite é modificado, no intuito de melhorar sua digestibilidade e aproximá-lo da composição nutricional do leite humano. Desta forma, as modificações mais comuns são:

- proteínas: redução do teor total de proteínas e acréscimo de proteínas do soro, para aumentar a proporção destas em relação à quantidade de caseína, visando melhorar a digestibilidade do produto. Aminoácidos também costumam ser acrescentados, especialmente a taurina, essencial para o desenvolvimento do tecido nervoso.
- lipídios: inicialmente o leite é desnatado, e posteriormente recebe óleos vegetais poliinsaturados, para melhorar o perfil lipídico e a digestibilidade da fórmula. Alguns

produtos utilizam também óleo de peixe e gordura láctea em sua composição, para aumentar a oferta de ácidos graxos essenciais.

- glicídios: as fórmulas podem utilizar tanto a lactose, a exemplo do leite humano, como mistura de glicídios (maltodextrina/maltose/lactose) ou mesmo apenas a maltodextrina.
- vitaminas: são acrescentadas, para atender às recomendações nutricionais.
- minerais: o conteúdo mineral do leite integral é reduzido e aproximado ao teor de minerais do leite humano. A maioria das fórmulas recebe acréscimo de ferro.

A ausência de fatores de proteção, bem como o risco aumentado para o surgimento de infecções do trato gastrointestinal e respiratório, alergias e inadequações nutricionais, são características que colocam as fórmulas infantis industrializadas em situação de desvantagem em relação ao leite materno na promoção de saúde, à luz da segurança alimentar, ainda que as mesmas atendam às recomendações preconizadas no *Codex Alimentarius* (GONÇALVES e MELO, 2014, p. 10; ARPINI e ARPINI, 2014, p. 453).

2.3 Importância dos minerais na nutrição do recém-nascido

A exemplo da adequação do teor de macronutrientes, também faz-se necessário um aporte ajustado de micronutrientes, para dar suporte ao pleno desenvolvimento, tendo em vista a elevada taxa de crescimento dos lactentes e por estes serem os organismos mais sensíveis às deficiências de elementos essenciais e às infecções (BATES, 1994 *apud* MORGANO et al., 2005, p. 819). O colostro apresenta uma concentração mineral superior a do leite maduro; todavia, de uma forma geral, as necessidades do bebê são satisfeitas até os 6 meses, sem sintomas de deficiência (BRASIL, 2015, p. 22).

Níveis adequados de ferro (Fe), de cobre (Cu) e de iodo (I) são necessários à manutenção dos processos metabólicos, desenvolvimento tecidual e crescimento pleno dos bebês (St. REMY et al, 2004, p.1104). Cálcio (Ca) e fósforo (P) são necessários à mineralização óssea fetal e pós-natal (TRINDADE, 2005, p.43).

O zinco (Zn) é necessário aos processos de reparação e cicatrização tecidual, às funções imunológicas, à manutenção das funções cerebrais e ao metabolismo da vitamina A, que atua como importante fator de proteção imunológica, bem como na integridade da visão (YANAGISAWA, 2008, p. 334; MELLO e COELHO, 2011, p. 39). Inúmeros processos metabólicos são dependentes deste mineral, como os processos de divisão celular e síntese de proteínas do DNA (YANAGISAWA, 2008, p. 335; FERNÁNDEZ-MENÉNDEZ et al., 2016, p. 246).

Níveis inadequados de ferro causam anemia e prejuízos que podem comprometer tanto o desenvolvimento físico quanto intelectual da criança (RAO e GEORGIEFF, 2007; FRIEL et al., 2003 *apud* FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2012, p. 108). Seu conteúdo no leite humano, em valor absoluto, é reduzido, assim como no leite de vaca. Entretanto, o menor teor de proteínas e fósforo, aliado às concentrações aumentadas de vitamina C e lactose, conferem ao ferro proveniente do leite materno uma maior biodisponibilidade, e dessa forma, o aleitamento materno exclusivo representa menor risco de anemia antes dos 6 meses. O baixo teor de ferro no leite humano, na realidade, configura-se em benefício à saúde do bebê: preserva a ação bacteriostática da lactoferrina, por mantê-la em sua forma insaturada (BALDAN, FARIAS e BÁCARO, 2013, p. 5).

2.4 Importância do conhecimento sobre a especiação química de um elemento em determinado alimento

No campo da Ciência dos Alimentos, embora o conhecimento da composição elementar de nutrientes seja importante do ponto de vista nutricional, a identificação e a quantificação de formas químicas individuais dos nutrientes inorgânicos, como biomoléculas, tem se revelado muito mais importante, tendo em vista a atuação das espécies químicas individuais nos processos metabólicos. A identificação da forma físico-química particular em que o elemento se encontra é o que determina a sua biodisponibilidade, atividade biológica, transporte e metabolismo, bem como a sua toxicidade (St. REMY et al, 2004, p. 1109). Isso poderia explicar por que os micronutrientes do leite humano, mesmo quando em quantidades totais inferiores às das fórmulas industrializadas, são melhor aproveitados pelos lactentes. Desta forma, justifica-se o interesse da análise química de especiação em áreas como medicina, nutrição, bioquímica e farmacologia.

As técnicas de especiação química têm por objetivo identificar e quantificar as várias formas de um elemento químico se apresentar em uma determinada amostra, as quais, em conjunto, constituem a concentração total daquele elemento na referida amostra (REIS e GONÇALVES, 2015, p. 1126). Originalmente, as análises de especiação eram utilizadas em estudos para avaliar contaminação da água, do solo e de sementes. O desenvolvimento de novas técnicas analíticas tem beneficiado cada vez mais a disseminação de conhecimento em áreas como a da saúde e a da Ciência dos Alimentos. Tal fato poderá permitir um melhor embasamento teórico das práticas assistenciais ao lactente no âmbito da nutrição, o que, por

sua vez, poderá contribuir para o fortalecimento da opção pelo leite humano como recurso terapêutico no ambiente das Unidades de Neonatologia.

2.5 Planejamento Estratégico Situacional

O Planejamento Estratégico Situacional (PES) é um método criado por Carlos Matus, economista chileno que, a partir da década de 1970, desenvolveu uma nova abordagem para resolver problemas de grande complexidade, como os sociais, em oposição ao modelo tradicional (Iida, 1993).

O método tradicional de planejamento foi amplamente difundido na América Latina desde os idos de 1950, inicialmente como uma técnica simples de projeções econômicas. Aos poucos, tornou-se a maneira de planejar o desenvolvimento econômico e social. Este método é caracterizado como um modelo autoritário e pobre de rigor científico, onde o Estado ou governante é o autor, a figura principal, a qual ignora os demais atores do processo social e não está submetida às mesmas regras que os demais. Restringe-se ao aspecto econômico e faz limitadas projeções sociais, planejando o futuro com base em diagnóstico do passado.

Em contrapartida, o PES é um método de planejamento onde não há um ator destacado. Matus usa a figura metafórica de um jogo (HUERTAS, 1993), para demonstrar que os vários atores do processo social são contemplados e valorizados. Trata-se de um jogo de conflitos, de interesses e de cooperação, com várias possibilidades de resolução para o problema, onde cada ator tem de vencer uma resistência ativa e criativa dos outros atores para alcançar suas metas. Desta forma, ao final do processo, torna-se difícil apontar um único autor, uma vez que várias pessoas contribuíram para a mudança proposta.

A idéia de diagnóstico não existe no PES, uma vez que o método trabalha com a análise da situação atual. Esta característica o torna mais flexível e adequado para abordar problemas de grande complexidade, pois admite adaptação às constantes mudanças que são passíveis de acontecer numa situação real. As circunstâncias da situação indicam qual a ação mais efetiva a ser executada.

Ao conceituar os atores, Matus compreende o indivíduo e a sua situação, ou seja, o contexto no qual o ator se insere e sua capacidade de contribuir ou interferir no processo de resolução do problema.

No método PES, o problema é entendido como uma situação que se apresenta diferente daquilo que deveria ou poderia ser, o que traz insatisfação para um ou mais atores. O plano é uma aposta estratégica para tentar solucionar um problema ou realizar um intercâmbio

de problemas, ou seja, substituir um problema de valor alto por outro de valor mais baixo. A estratégia diz respeito ao que é importante para se alcançar um grande objetivo, traduzido em uma mudança que possibilite solucionar o problema ou diminuir seu impacto negativo; permite construir um caminho (HUERTAS, 1993).

Operando com inteligência e tato, considerando os vários atores e o contexto da situação onde se pretende mudar, o planejamento estratégico situacional é aplicável a qualquer organismo onde o centro do jogo não seja exclusivamente o mercado, mas sim o jogo político, econômico e social, com a construção de caminhos para se transitar com os pés no presente e olhar no futuro.

3 ANÁLISE DE PROBLEMAS

3.1 Árvore de Problemas

A árvore de problemas é uma ferramenta que permite ao gestor conduzir um processo de mudança (SOUZA, 2010, p. 96).

Após a identificação de um problema, a construção da árvore irá mostrar, de forma clara e objetiva, a relação entre as causas e o problema a ser atacado, bem como as possíveis consequências advindas do mesmo. Para tanto, é imprescindível definir corretamente o problema central.

A construção da árvore possibilita ao gestor visualizar o fluxo através do qual determinadas situações geram um problema, o qual por sua vez gera determinadas consequências, e assim, planejar ações efetivas para promover a mudança daquela situação, solucionando o problema ou diminuindo seu impacto negativo.

3.2 O problema, o Plano, a Política e a Estratégia

O problema: o uso de fórmulas e de aditivos de leite humano em prematuros internados na Unidade de Neonatologia

- O plano: Sensibilização dos profissionais da Unidade de Neonatologia: Conhecimento atualizado sobre composição química de micronutrientes e biomoléculas associadas para ampliar o uso do leite materno na abordagem nutricional do prematuro

- A política: Fortalecer o uso do leite humano como recurso terapêutico e primeira opção na abordagem nutricional do prematuro

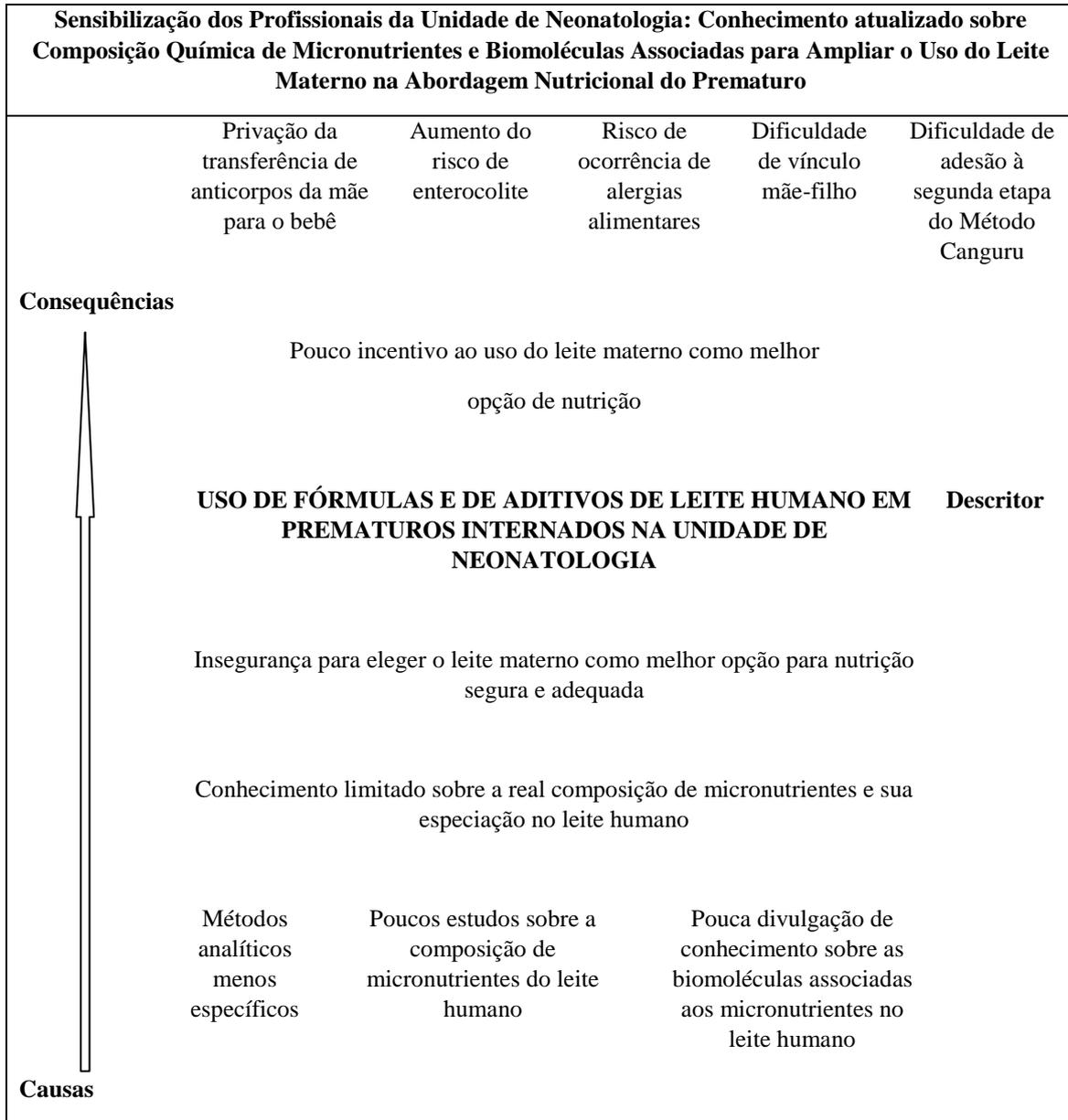
- A estratégia: A disseminação de conhecimento atualizado sobre a composição química de micronutrientes do leite humano e sua biodisponibilidade, através de instrumento escrito, junto aos profissionais que atuam na Unidade de Neonatologia

3.3 Árvore de Problemas do Projeto Aplicativo Proposto

A árvore de problemas construída para o presente trabalho tem como descritor o uso de fórmulas e aditivos de leite humano em prematuros internados na Unidade de Neonatologia.

Em função da diversidade de atores existente em uma situação, um mesmo problema pode ser percebido e abordado de formas diferentes. Assim, o projeto aplicativo proposto explora o problema sob a perspectiva da composição de micronutrientes, identificando como causa principal a insegurança para eleger o leite humano (LH) como melhor opção para a nutrição segura e adequada do prematuro internado na Unidade de Neonatologia. Tal fato deve-se à limitação do conhecimento atual sobre a real composição de micronutrientes presentes no leite humano e sua biodisponibilidade. Como consequências, temos o pouco incentivo ao uso do leite materno (LM) como melhor opção de nutrição para o prematuro, o que acarreta a privação dos benefícios da transferência de anticorpos maternos para o bebê, o aumento do risco de enterocolite e de alergias alimentares e a dificuldade de vínculo mãe-filho e de adesão à segunda etapa do Método Canguru.

A seguir, podemos observar a árvore de problemas construída para o projeto aplicativo proposto:



Fonte: Elaborado pela autora, 2016

4 ATORES SOCIAIS

4.1 Conceito

Atores sociais são os autores e sujeitos da estratégia, de acordo com o método PES (HUERTAS, 1993). Devem ser compreendidos juntamente com a sua inserção no contexto político, social ou econômico. Sua percepção da realidade que se pretende modificar, bem como seus próprios interesses, influenciam em termos de apoio ou resistência ao plano proposto como um todo ou a alguma de suas operações.

4.2 Matriz de Identificação e Relevância dos Atores

ATOR SOCIAL	VALOR	INTERESSE
A1 – A mestranda	Alto	+
A2 - Orientadores	Alto	+
A3 – Colaboradores (bolsistas, equipe de assistência do Banco de Leite da Maternidade Escola residentes, estagiários)	Alto	+
A4 – Equipe do Laboratório de Desenvolvimento Analítico (LaDA) do Instituto de Química da UFRJ	Alto	+
A5 – Doadoras das amostras de leite	Alto	+
A6 – Direção da Maternidade Escola da UFRJ	Alto	+
A7 – Equipe multidisciplinar de cuidados da Unidade de Neonatologia	Alto	+
A8 – Serviço de Nutrição da Maternidade Escola da UFRJ	Alto	+

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

5 PLANO DE AÇÃO

É o caminho a ser construído para se chegar à resolução do problema. Este caminho é construído através de etapas e operações que levam em consideração o jogo de interesses, de conflitos e de cooperação entre os diversos atores envolvidos, bem como os recursos necessários e disponíveis para a execução de cada operação.

Uma vez que o planejamento estratégico situacional não é estático, podendo ser ajustado e corrigido sempre que necessário, o plano de ação prevê a construção de indicadores para realizar o monitoramento de seus resultados.

5.1 Apresentação das Operações

As operações (Op), segundo o pensamento de Matus, são as ações definidas pelo ator, suas apostas no plano, e estão dentro do seu espaço de governabilidade (IIDA, 1993).

Este projeto aplicativo contempla as seguintes operações:

Op1 – Captar, dosar e analisar os resultados das amostras

Op2 – Elaborar instrumento escrito para subsidiar a tomada de decisão em prol do leite materno no momento da prescrição nutricional

Op3 – Promover a sensibilização da equipe através da apresentação dos dados gerados nas análises químicas

Op4 – Apresentar o instrumento desenvolvido

Op5 – Articular o uso do instrumento na rotina assistencial ao prematuro

Op6 – Comparar o número de prematuros com prescrição de leite materno antes e depois da implementação das operações Op3, Op4 e Op5

5.2 Plano de ação do projeto aplicativo proposto

Operações		Recursos
Dificuldades	Facilidades	
Captar, dosar e analisar os resultados das amostras.		Recursos Cronograma Responsável Avaliação Monitoramento
- Adesão à pesquisa pelas pacientes que tiveram parto prematuro.	Coleta realizada no local de trabalho, dentro das rotinas de cuidado.	
Convênio firmado com o CNPq e estrutura assistencial da Maternidade Escola.		Finanças Organizações Poder Materiais
Convênio interinstitucional firmado com o Instituto de Nutrição e com o Instituto de Química da UFRJ; bolsistas; Autonomia para realizar a captação das amostras; apoio da Direção, do Serviço de Nutrição e do Programa de Mestrado Profissional da MEURJ; autonomia da equipe do Laboratório de Desenvolvimento Analítico do Instituto de		
Adquiridos com recursos do projeto. Estrutura assistencial da Maternidade Escola.		Cronograma Responsável Avaliação Monitoramento
Agosto de 2015 a Agosto de 2016		
A mestrandia, seus orientadores e colaboradores. Equipe do Laboratório de Desenvolvimento Analítico do Instituto de		Cronograma Responsável Avaliação Monitoramento
Reuniões periódicas para avaliar o ritmo de realização do		
Número de amostras coletadas/semana; número de amostras efetivamente dosadas; número de amostras coletadas x		Cronograma Responsável Avaliação Monitoramento

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Ação Estratégica 2: Elaborar instrumento escrito com informações baseadas nos resultados das análises químicas do leite humano cru em suas diferentes fases de maturação										
Operações	Dificuldades	Facilidades	Recursos				Cronograma	Responsável	Avaliação	Monitoramento
			Financeiros	Organizativos	Poder	Materiais				
Elaborar instrumento escrito para subsidiar a tomada de decisão no momento da prescrição do cuidado nutricional.	Adequar o instrumento às necessidades da equipe multidisciplinar.	Etapa realizada no local de trabalho, dentro das rotinas de cuidados com o prematuro.	Convênio firmado com o CNPq e estrutura operacional da Maternidade Escola.	Reunião geral com as chefias dos serviços que integram a equipe multidisciplinar de cuidados da Unidade de Neonatologia da Maternidade Escola para pactuações.	Apoio da Direção da Instituição e das chefias dos serviços que integram a equipe multidisciplinar de cuidados da Unidade de Neonatologia da Maternidade Escola da UFRJ.	Adquiridos com recursos do projeto. Estrutura assistencial da Maternidade Escola.	Agosto a Setembro de 2016	A mestrandia, seus orientadores e colaboradores.	Avaliar a adequação do modelo do instrumento à rotina da equipe multidisciplinar.	Retorno proveniente das reuniões para avaliação da adequação do instrumento.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Ação Estratégica 3: Divulgação do instrumento desenvolvido na Ação Estratégica 2 e sensibilização da equipe multidisciplinar de cuidados da Unidade de Neonatologia	
Operações	Recursos
<ul style="list-style-type: none"> - Promover a sensibilização da equipe através da apresentação dos dados gerados nas análises químicas. - Apresentar o instrumento desenvolvido. - Articular o uso do instrumento na rotina assistencial ao prematuro. 	<ul style="list-style-type: none"> Número de equipes que atuam na Unidade de Neonatologia
<ul style="list-style-type: none"> Motivação da equipe para Ciência e Tecnologia. Permanente qualificação de profissionais. Capacitação de novos profissionais. 	<ul style="list-style-type: none"> Facilidades
<ul style="list-style-type: none"> Convênio firmado com o CNPq e recursos da estrutura assistencial da Maternidade Escola. 	<ul style="list-style-type: none"> Financeiros
<ul style="list-style-type: none"> Rounds e sessões clínicas multidisciplinares semanais. Treinamentos em serviço. Capacitações profissionais. 	<ul style="list-style-type: none"> Organizativos
<ul style="list-style-type: none"> Apoio da Direção da Instituição e das chefias dos serviços que integram a equipe multidisciplinar de cuidados da Unidade de Neonatologia da Maternidade Escola da UFRJ. 	<ul style="list-style-type: none"> Poder
<ul style="list-style-type: none"> Estrutura assistencial e de ensino da Maternidade Escola. 	<ul style="list-style-type: none"> Materiais
<ul style="list-style-type: none"> Agosto a Setembro de 2016. 	<ul style="list-style-type: none"> Cronograma
<ul style="list-style-type: none"> A mestrandia, chefias dos serviços integrantes da equipe multidisciplinar de cuidados neonatais. 	<ul style="list-style-type: none"> Responsável
<ul style="list-style-type: none"> Avaliar a adesão ao uso do instrumento na rotina assistencial. 	<ul style="list-style-type: none"> Avaliação
<ul style="list-style-type: none"> Retorno proveniente das reuniões para avaliação da adesão ao instrumento. 	<ul style="list-style-type: none"> Monitoramento

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Ação Estratégica 4: Avaliar a adesão da equipe multidisciplinar da Unidade de Neonatologia quanto ao uso do leite materno na abordagem nutricional de prematuros										
Operações	Dificuldades	Facilidades	Recursos				Cronograma	Responsável	Avaliação	Monitoramento
			Financeiros	Organizativos	Poder	Materiais				
Comparar o número de prematuros com prescrição de leite materno antes e depois da implementação da Ação Estratégica 3.	Disponibilidade de tempo e de recurso humano para fazer o levantamento em prontuários arquivados.	Informação registrada diariamente em prontuário e também enviada por escrito ao Lactário.	Recursos da estrutura assistencial da Maternidade Escola.	Consulta aos prontuários de prematuros internados na Unidade de Neonatologia, aos mapas do Lactário e aos prontuários arquivados .	Apoio da Direção da Instituição, das chefias dos serviços que integram a equipe multidisciplinar de cuidados da Unidade de Neonatologia e do Setor de Arquivo da Maternidade Escola da UFRJ	Próprios da rotina assistencial da Maternidade Escola.	A partir de Setembro de 2016.	A mestrandia, residentes e estagiários que estiverem lotados no setor Banco de Leite/Lactário durante o período da ação.	Avaliar o uso do leite materno na abordagem nutricional do prematuro internado na Unidade de Neonatologia.	Estatística mensal sobre coleta e distribuição de leite materno, número de doadoras exclusivas atendidas pelo banco de Leite e de prematuros que iniciaram a alimentação com leite materno.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

5.3 Apresentação dos Recursos

R1 – estrutura assistencial da Maternidade Escola da UFRJ

R2 – convênio firmado com o CNPq

R3 – convênio interinstitucional firmado entre o Instituto de Nutrição, o LaDA e a Maternidade Escola

R4 – reuniões de equipe para pactuações

R5 – apoio da Direção da Maternidade Escola da UFRJ

R6 – apoio da equipe multidisciplinar de cuidados da Unidade de Neonatologia da Maternidade Escola

R7 – estrutura de ensino da Maternidade Escola

R8 – rounds e sessões clínicas multidisciplinares semanais

R9 – treinamentos em serviço e capacitações

R10 – prontuários dos bebês e protocolos do lactário

5.4 Matriz de Motivações

Avalia o apoio (+) e a oposição (-) dos atores às operações propostas no plano de ação.

ATORES	OPERAÇÕES					
	Op1	Op2	Op3	Op4	Op5	Op6
A1	+	+	+	+	+	+
A2	+	+	+	+	+	+
A3	+					+
A4	+					
A5	+					
A6	+	+	+	+	+	+
A7			+	+	+	
A8	+	+	+	+	+	+

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

5.5 Matriz de Recursos:

Avalia os recursos necessários a cada operação prevista no plano de ação.

RECURSOS	OPERAÇÕES					
	Op1	Op2	Op3	Op4	Op5	Op6
R1	■		■	■	■	■
R2	■					
R3	■	■				
R4	■	■	■	■	■	
R5	■	■	■	■	■	■
R6	■	■	■	■	■	■
R7		■	■	■	■	
R8		■	■	■	■	
R9			■	■	■	
R10			■	■	■	■

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

5.6 Matriz de Controle de Recursos

Avalia a intensidade relativa que os atores exercem sobre os recursos. Ao realizarmos as somas verticais, todas darão 100%.

ATORES	RECURSOS									
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
A1	10		10	50	20	40	20	20	20	20
A2	10		30		20					
A3	10									20
A4		100	30							
A5	30									
A6	20		30		60	10	60		10	20
A7	10			50		50	20	80	70	30
A8	10									
Soma	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

5.7 Análise de Viabilidades

OPERAÇÃO	RECURSOS				Soma
	R1	R2	R3	R5	
Op1					
Apoio +A1	10		10	20	40
+A2	10		30	20	60
+A3	10				10
+A4		100	30		130
+A5	30				30
+A6	20		30	60	110
+A8	10				10
Soma	+90	+100	+100	+100	+390

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

OPERAÇÃO	RECURSOS			Soma
	R3	R5	R7	
Op2				
Apoio +A1	10	30	20	60
+A2	30	20	60	110
+A6	30	60		90
+A8				
Soma	+70	+110	+80	+260

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

OPERAÇÃO	RECURSOS							Soma
	R1	R4	R5	R6	R7	R8	R9	
Op3								
Apoio +A1	10	50	20	40	20	20	30	190
+A2	10		20					30
+A6	20		60	10	60		10	160
+A7	10	50		50	20	80	70	280
+A8	10							10
Soma	+60	+100	+100	+100	+100	+100	+110	+670

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

OPERAÇÃO	RECURSOS							Soma
	R1	R4	R5	R6	R7	R8	R9	
Op4								
Apoio +A1	10	50	30	40	20	20	20	190
+A2	10		20					30
+A6	20		60	10	60		10	160
+A7	10	50		50	20	80	70	280
+A8	10							10
Soma	+60	+100	+110	+100	+110	+100	+100	+670

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

OPERAÇÃO	RECURSOS						Soma
	R1	R4	R5	R6	R8	R9	
Op5							
Apoio +A1	10	50	30	40	20	20	170
+A2	10		20				30
+A6	20		60	10		10	100
+A7	10	50		50	80	70	260
+A8	10						10
Soma	+60	+100	+110	+100	+100	+100	+570

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

OPERAÇÃO	RECURSOS			Soma
	R1	R5	R10	
Op6				
Apoio +A1	10	30	30	70
+A2	10	20		30
+A3	10		20	30
+A6	20	60	20	100
+A8	10			10
Soma	+60	+110	+70	+240

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

5.8 – Balanço de Viabilidades:

OPERAÇÕES	BALANÇO
Operação 1 (Op1)	+390
Operação 2 (Op2)	+260
Operação 3 (Op3)	+670
Operação 4 (Op4)	+670
Operação 5 (Op5)	+570
Operação 6 (Op6)	+240

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

De acordo com o balanço de viabilidades, pode-se observar que todas as operações apresentam grande viabilidade, sendo as operações Op3 e Op4 as mais viáveis, seguidas da Op5. Estas são as operações que contam com o maior número de atores envolvidos, e portanto, o apoio advindo dos mesmos sugere que a situação é favorável à aplicação do projeto proposto. Já as operações Op1 e Op2 dizem respeito à geração do conhecimento e criação do instrumento para divulgá-lo. Por fim, a operação que apresentou menor índice de viabilidade, ainda que alto, é a que diz respeito ao monitoramento, ou seja, Op6.

6 RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se ampliar uso do leite materno e diminuir o consumo de fórmulas lácteas e aditivos na abordagem nutricional do prematuro, através da sensibilização dos profissionais da Unidade de Neonatologia à luz do conhecimento atualizado sobre a composição química de micronutrientes e biomoléculas associadas no leite humano.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.A.G. **Amamentação**: um híbrido natureza-cultura. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1999.

ALMEIDA, J.A.G.; NOVAK, F. R. Amamentação: um híbrido natureza-cultura. **Jornal de Pediatria**. v.80, n.5, p. s119-s125, 2004. Suplemento.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento de bancos de leite humano. Resolução n.171, de 4 de setembro de 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2006. Seção 1, p. 33. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/712270/pg-35-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-05-09-2006>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Banco de leite humano**: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília: Anvisa, 2008. (Série Tecnologia em Serviços de Saúde)

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Perguntas e respostas sobre fórmulas infantis**: gerência de produtos especiais: gerência geral de alimentos. Brasília: Anvisa, 2014. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1b72ce0043163045ac68bde6ad24d25c/Perguntas+e+Respostas+sobre+F%C3%B3rmulas+Infantis_3a+vers%C3%A3o_fev+2014.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 22 mar. 2016.

ARPINI, L. S. B; ARPINI, A. F. Integração dos campos de saúde coletiva e alimentação e nutrição num contexto de promoção da saúde relacionado às doenças crônicas não transmissíveis. **Demetra**, v. 9, n. 2, p. 451-465, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.12957/dmetra.2014.8502>> Acesso em: 15 jan. 2016.

BALDAN, M. A; FARIAS, V. P; BÁCARO, S. D. Comparativo entre aleitamento materno exclusivo e outros tipos de leite no desenvolvimento imunológico de crianças de 0 a 12 meses. **Revista Funec Científica.**, v. 1, n. 1, 201. Disponível em: <http://seer.funecsantafe.edu.br/index.php?journal=rfcn&page=article&op=view&path%5B%5D=969&path%5B%5D=952>>. Acesso em: 11 jan. 2016.

BRASIL. Carta de Brasília 2015. Brasília, Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br/carta+de+bras%EDlia+2015.>> Acesso em: 18 mar. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Amamentação e uso de medicamentos e outras substâncias. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. 2 ed. Brasília:MS, 2010. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Atenção Humanizada ao Recém-Nascido de Baixo Peso – Método Mãe Canguru. Brasília. Ministério da Saúde, 2013. 2ed. (Manual Técnico).

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da Criança**: aleitamento materno e alimentação complementar. Cadernos de Atenção Básica. 2 ed. Brasília, 2015. (Cadernos de Atenção Básica, 23) Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_crianca_aleitamento_materno_cab23.pdf> Acesso em: 13 de Março de 2016

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M. L., et al. Iron content and its speciation in human milk from mothers of preterm and full-term infants at early stages of lactation: a comparison with commercial infant milk formulas. **Microchemical Journal**, v.105, p.108-114, 2012.

FERNÁNDEZ- MENÉNDEZ, S. et al. Total zinc quantification by inductively coupled plasma-mass spectrometry and its speciation by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry in human Milk and commercial formulas: Importance in infant nutrition. **J. Chromatogr.**, v.146, p. 246-254, 2016

GONÇALVES, R. M.; MELO, C. S. Aleitamento materno versus aleitamento artificial. **Estudos Goiânia**, v. 41, especial, p. 7-14, 2014. Disponível em:

<https://seer.ucg.br/index.php/estudos/article/download/3804/2168>. Acesso em: 11 de Janeiro de 201.

HUERTAS, F. El Método PES. Mar., 1993. Disponível em:
<www.cepal.org/ilpes/noticias/paginas/2/36342/LIBRO_ENTREVISTA_CON_MATUS.pdf. Acesso em: 20 de Abril de 2016.

IIDA, I. Planejamento Estratégico Situacional. Prod. v. 3, n.2, p.113-125, jul./dec.1993. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1590/50103-65131993000200004>. Acesso em: 03 de Maio de 2016.

MELLO, E. D.; COELHO, J. C. Zinco: por que e quando suplementar? **I.J.N.**, v.4, n.2, p.38-43, 2011.

MORGANO, M. A. et al. Composição mineral do leite de bancos de leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.25, n. 4, p. 819-824, 2005.

REIS, L.S.; GONÇALVES, E.C.B.A. Chemical speciation: an instrument for evaluation of mineral bioavailability. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.45, n.6, p.1126-1132, 2015

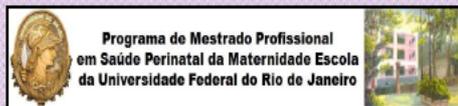
SOUZA, B.C.C. Gestão da Mudança e da Inovação: Árvore de Problemas como Ferramenta para Avaliação do Impacto da Mudança. *Revista de Ciências Gerenciais*, v.14, n.19, p.89-106, 2010.

REMY, R. R., et al. Multi elemental distribution patterns in premature human milk whey and pre-term formula milk whey by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octopole reaction cell. **J. Anal. At. Spectrom.**, v.19, p. 1-8. 2004.

TRINDADE, C. J. Importância dos minerais no pré-termo extremo. **J. Ped.**, v. 81, n. 1, p. 43-51. 2005. Suplemento.

YANAGISAWA, H. Zinc deficiency and clinical practice – validity of zinc preparations. *yakugaku zasshi. Japan: The Pharmaceutical Society of Japan*, v.128, n. 3, p. 333-339, 2008.

APÊNDICE B – Cartilha



USO TERAPÊUTICO DO LEITE MATERNO: NUTRIÇÃO, SAÚDE E PROTEÇÃO PARA O BEBÊ PREMATURO

As diversas associações entre proteínas bioativas e minerais favorecem a biodisponibilidade de micronutrientes no leite humano e influenciam positivamente as defesas imunológicas e antioxidantes do prematuro.

O uso do leite materno como recurso terapêutico durante o período de internação na Unidade de Terapia Intensiva, promove a nutrição adequada e a adaptação do recém-nascido prematuro ao meio extra-uterino, diminui o risco de infecções e de outras doenças associadas, proporciona melhor resposta à terapia medicamentosa, evita deficiências nutricionais, fortalece o apego mãe-filho, reduz o tempo de internação e diminui o risco de reinternações após a alta hospitalar, tornando-o o melhor e mais seguro alimento a ser administrado ao prematuro.

**VAMOS PROMOVER SAÚDE:
VAMOS PROMOVER O USO TERAPÊUTICO
DO LEITE MATERNO**

Produto elaborado pela mestranda Vânia de Oliveira Trinta como parte dos requisitos para conclusão do Mestrado Profissional em Saúde Perinatal.

O bebê prematuro é introduzido de forma precoce à vida extra-uterina, tendo de responder a esta sem ter recebido o preparo fisiológico que ocorre no terceiro trimestre da gestação. Assim como o sistema imune, também o trato gastrointestinal é forçado a se adaptar precoce e rapidamente, iniciando suas funções sem estar totalmente desenvolvido. Portanto, a nutrição apresenta papel de destaque no desenvolvimento do bebê nascido prematuramente.

POTENCIAIS EFEITOS ADVERSOS DA PREMATURIDADE:

	Imaturidade fisiológica	
Privação da transferência materna de agentes antioxidantes		Privação da transferência materna de agentes imunobiológicos
Baixa incorporação de minerais, levando a baixos estoques		Baixos níveis circulantes de anticorpos
Necessidade de oxigenoterapia		Necessidade de procedimentos invasivos

RISCO AUMENTADO PARA A OCORRÊNCIA DE:

Danos oxidativos de membranas celulares e tecidos	Carências nutricionais e alergias alimentares	Infecções, retinopatia da prematuridade, doença pulmonar crônica e enterocolite necrosante
---	---	--

Promover o uso terapêutico do leite materno é importante pois:

- O leite materno protege o prematuro de danos oxidativos das mucosas, que quando lesionadas, perdem sua integridade e ficam mais expostas, aumentando o risco de doenças como a retinopatia da prematuridade, a doença pulmonar crônica e a enterocolite necrosante.

- O leite materno fornece ferro, zinco, cobre e iodo em quantidades adequadas e ajustadas às necessidades do prematuro. Apesar destes micronutrientes serem necessários em pequenas quantidades, quando seus níveis estão deficientes, ocorre comprometimento do funcionamento do organismo do prematuro, já que eles atuam em diversas e importantes vias metabólicas.

- No leite humano, ferro, zinco, cobre e iodo estão associados a biomoléculas do sistema imunológico e do sistema antioxidante, e estas associações aumentam a biodisponibilidade destes micronutrientes e facilitam seu aproveitamento pelo prematuro.

- A quantidade total de ferro presente no leite humano, aliada ao perfil de associações com imunoglobulinas, evita que o micronutriente circule livre no organismo do prematuro, favorecendo a manutenção da capacidade bacteriostática da lactoferrina. O mesmo não acontece com o uso das fórmulas, que possuem maior teor de ferro.

- Prematuros alimentados com leite artificial recebem teores aumentados de minerais, por que esta quantidade elevada é necessária para compensar sua menor biodisponibilidade.

- O uso de aditivos pode diminuir a biodisponibilidade dos micronutrientes do leite humano e comprometer sua capacidade antioxidante e bacteriostática.

APÊNDICE C - Artigo

Análise Química da Biodisponibilidade de Micronutrientes Inorgânicos em Leite Humano Ordenhado

Resumo: O emprego de análises de especiação química com utilização da técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, tem gerado novos conhecimentos na área da Saúde sobre a composição química de micronutrientes e sua associação a biomoléculas no leite humano. Objetivou-se neste estudo quantificar os teores de ferro, de cobre, de zinco e de iodo e realizar a especiação destes elementos no leite cru de puérperas adultas da Maternidade Escola do Rio de Janeiro, Brasil, de parto pré-termo e a termo nas fases de colostro, leite de transição e leite maduro. Os teores encontrados de ferro, de cobre, de zinco e de iodo no leite das puérperas de parto prematuro e de parto a termo foram: 0,9967mg/L e 0,7369mg/L; 0,5058mg/L e 0,2338mg/L; 4,4158mg/L e 2,9062mg/L; 0,4575mg/L e 0,2685mg/L. A análise de especiação evidenciou os padrões de associações de ferro, de cobre, de zinco e de iodo a biomoléculas presentes nas amostras de leite cru de puérperas de parto prematuro e de parto a termo.

Palavras-chave: Leite humano, aleitamento materno, micronutrientes, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

Abstract: New knowledge on the chemical composition of micronutrients and its association with biomolecules in human milk has been generated by using inductively coupled plasma mass spectrometry. The objective of the study was to quantify the iron, copper, zinc and iodine contents and to perform the speciation of these elements in raw milk of preterm and full term adult mothers in the Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, in phases of colostrum, transitional milk and mature milk. The iron, copper, zinc and iodine levels found in the milk of the preterm and full term delivery mothers were: 0.9967mg/L and 0.7369mg/L; 0.5058mg/L and 0.2338mg/L; 4.4158mg/L and 2.9062mg/L; 0.4575mg/L and 0.2685mg/L. The patterns of iron, copper, zinc and iodine associations to biomolecules, present in raw milk samples of the preterm and full term delivery mothers, were evidenced by speciation analysis.

Keywords: Human milk, breastfeeding, micronutrients, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.

Introdução

A relação entre nutrição na fase inicial precoce da vida e o genoma influencia os mecanismos disparadores dos processos de saúde e de doença do indivíduo. Quando desfavorável, esta interação abre campo para o surgimento de doenças que representam os principais problemas de saúde pública no cenário mundial: obesidade, distúrbios cardiovasculares, doenças imunes e autoimunes, doenças neurológicas e neurodegenerativas e alguns tipos de câncer¹.

O leite materno é mais que um alimento seguro: trata-se de um complexo sistema biológico que confere ao recém-nascido nutrição e proteção contra doenças transmissíveis e não transmissíveis². Além de atender aos requisitos nutricionais e imunológicos do lactente, é compatível ao desenvolvimento do trato gastrointestinal imaturo^{3,4}. Dentre os vários fatores que destacam a importância dos atributos do leite humano frente aos requisitos do prematuro, está a biodisponibilidade de seus micronutrientes, pois permite um aproveitamento mais eficiente, ainda que quantitativamente seus teores sejam inferiores aos dos produtos industrializados^{3,4,5,6}.

Do ponto de vista nutricional, o papel dos micronutrientes presentes no leite humano merece mais estudos, quando comparado aos macronutrientes, e tem-se observado um crescente interesse por esta temática, em virtude do seu impacto na saúde do prematuro^{7,8}. Enquanto que a composição dos macronutrientes é amplamente discutida tanto em termos quantitativos quanto qualitativos, os micronutrientes comumente são abordados de forma quantitativa, sob a ótica de padrões de recomendações de ingestão diária⁷. A identificação da forma físico-química particular em que o elemento se encontra é o que determina a sua biodisponibilidade, atividade biológica, transporte e metabolismo, bem como a sua toxicidade^{7,8,9,10}. Isto poderia explicar por que os micronutrientes do leite humano, mesmo quando em quantidades totais inferiores às das fórmulas industrializadas, são melhor aproveitados pelos lactentes. Desta forma, justifica-se o interesse da análise química de especiação em áreas como nutrição, bioquímica, medicina e farmacologia. Atualmente, com o avanço do emprego de técnicas modernas de análise química de especiação, é possível identificar e quantificar associações dos micronutrientes com biomoléculas¹⁰, gerando novos conhecimentos sobre a composição química e a biodisponibilidade de minerais no leite humano.

O presente estudo objetivou quantificar os teores de Fe, Cu, Zn e I em amostras de leite humano cru, de puérperas adultas que tiveram parto a termo ou pré-termo, nas fases

colostro, leite de transição e leite maduro, e identificar a presença de biomoléculas associadas a estes elementos.

Método

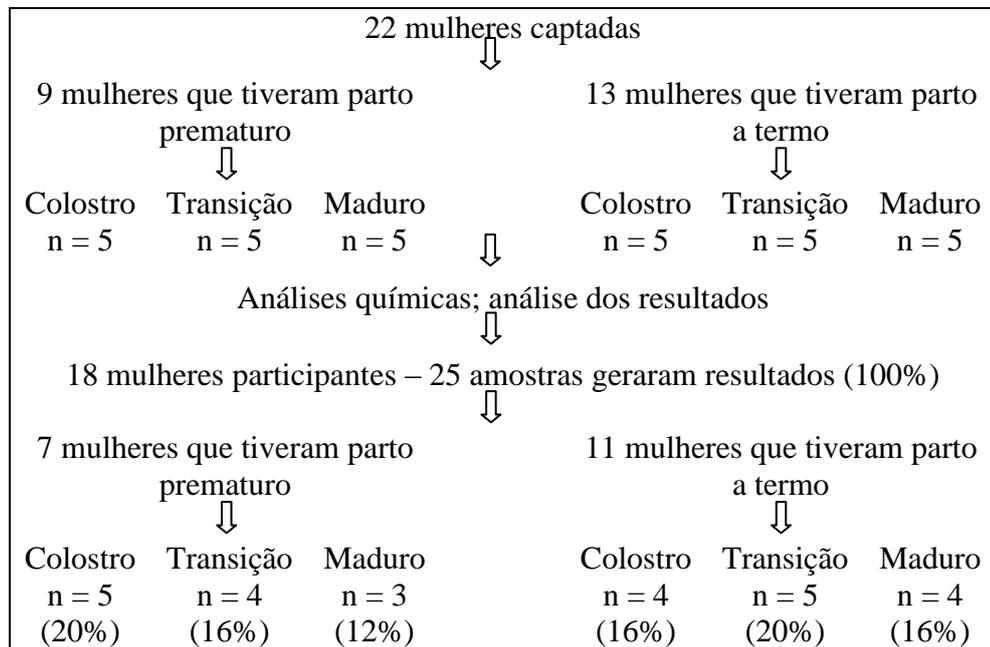
Delieamento e amostra do estudo: Trata-se de um estudo do tipo exploratório com amostra de conveniência, com um n de 30 amostras de leite de mulheres que tiveram partos a termo ou pré-termo em maternidade pública do Rio de Janeiro, Brasil, nos anos de 2015-2016, conforme os critérios de inclusão e de exclusão.

Critérios de inclusão: mulheres em aleitamento materno exclusivo e em livre demanda, ou que estavam realizando a ordenha no Banco de Leite, para posterior distribuição aos seus próprios lactentes internados na Unidade de Neonatologia, atendidas no parto/puerpério na maternidade estudada, adultas (idade cronológica ≥ 20 anos), de gestação de feto único, sem doenças crônicas, incluindo infecção por HIV.

Critérios de exclusão: o uso de medicamentos incompatíveis com a amamentação, segundo o Ministério da Saúde¹¹, e as intercorrências da mama lactante, tais como ingurgitamento mamário, fissura ou mastite.

As puérperas foram captadas nos seguintes setores da maternidade: Alojamento Conjunto, Banco de Leite, Alojamento Canguru e Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. Das 30 amostras coletadas, 25 (83,3%) geraram resultados, ocorrendo perda de 5 amostras, sendo 4 por volume insuficiente e 1 descartada por ser *outlier*. Portanto, os resultados apresentados neste estudo dizem respeito ao n final de 25 amostras, segundo o quadro 1:

Quadro 1: Fluxograma de distribuição das amostras para análise, segundo estágio de maturação do leite humano:



Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Coleta das amostras: Foram coletados dados obstétricos, características sócio-demográficas, clínicas e da assistência pré-natal, por meio de entrevista face a face padronizada e consulta aos prontuários das puérperas. Em frasco de polipropileno estéril, disponibilizado pelo Banco de Leite, as amostras foram coletadas e manipuladas segundo metodologia preconizada pela ANVISA¹². Ao término da coleta, o frasco foi tampado, identificado e congelado em freezer a -5°C , disponível no Banco de Leite, por no máximo 7 dias. A coleta das amostras de colostro (<7 dias pós-parto), de leite de transição (7 a 14 dias pós-parto) e de leite maduro (>14 mulheres que tiveram o parto a termo foram realizadas no Alojamento Conjunto, tendo sido transportadas em caixa isotérmica com gelo reciclável até o local de armazenamento, no Banco de Leite. Já as amostras de colostro, de leite de transição e de leite maduro de mulheres que tiveram o parto prematuro foram coletadas no Banco de Leite.

Análise das amostras: No Laboratório de Desenvolvimento Analítico – LaDA, do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UFRJ, as amostras de leite cru foram descongeladas imediatamente após a chegada e separadas em alíquotas de 2mL. Em seguida, as alíquotas foram submetidas a ultracentrifugação sob refrigeração a $15000 \times g$ e 4°C , com a finalidade de separar o soro da gordura e das caseínas. Para a obtenção do soro do

leite, foi utilizada ultracentrífuga refrigerada Hettich, modelo Mikro 220R (Andreas Hettich 145 GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemanha).

Determinação dos teores totais de Fe, Cu, Zn e I: As amostras foram submetidas à digestão ácida com mineralização em forno de microondas, para eliminação da parte orgânica, a fim de evitar perda de precisão e de sensibilidade na leitura da parte mineral. Posteriormente, foram analisadas pela técnica de Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS).

Análise química de especiação de Fe, Cu, Zn e I: foi adotada metodologia desenvolvida por St. Remy et al⁷, com realização de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), para separação das proteínas do leite, acoplada em linha ao ICP-MS. Para leitura dos resultados, foram adotadas as faixas de separação das proteínas segundo o peso molecular, conforme metodologia citada:

- >600 – 160 KDa: faixa onde encontram-se as imunoglobulinas
- 90 – 70 KDa: faixa onde encontra-se a lactoferrina e glutathionas
- 40 – 30 KDa: faixa onde encontra-se resíduo de caseínas e a superóxido dismutase
- 20 – 10 KDa: faixa onde encontram-se a lisozima e a glutathiona oxidase
- <10 KDa: faixa na qual o mineral encontra-se na sua forma inorgânica

A cromatografia foi realizada com a utilização do HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 140 (Amersham Biosciences), equipado com um loop de 50µL e um sistema de filtração. Para detecção molecular, foi utilizado o detector UV-Vis 141. A coluna de separação cromatográfica foi a de 142upx™ 200 Incease. Para a determinação dos totais e para a análise de especiação, o equipamento utilizado foi o modelo quadrupolo ICP-MS Thermo Scientific 131 iCAP Qc (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha).

Questões éticas: O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro em 19 de Dezembro de 2014 (Parecer 923.381).

Análise dos resultados: Os resultados obtidos das análises químicas foram comparados em relação aos teores totais dos micronutrientes inorgânicos, e em relação às biomoléculas a eles associadas, por meio de medidas de frequência e de dispersão (médias, desvio-padrão). O pacote estatístico utilizado foi o SPSS versão 21.

Resultados

As puérperas que integraram o grupo de parto prematuro apresentaram idade média de 30,86 anos (22 – 43 anos), e as integrantes do grupo de parto a termo apresentaram idade média de 26,91 anos (21 – 39 anos). As características sócio-demográficas, da assistência pré-natal e do parto, pertinentes às puérperas integrantes do estudo estão ilustradas na tabela 1.

Os dois grupos foram formados por maioria cuja cor da pele era negra ou parda, que cursou até o ensino médio e fez pré-natal fora da Maternidade Escola. No grupo de puérperas de parto prematuro, 57,1% ($n=4$) realizaram 7 ou mais consultas ao longo do pré-natal, e no grupo de puérperas de parto a termo, foram 72,7% ($n=8$). O pré-natal foi iniciado precocemente, antes da 14ª semana de gestação, para 57,1% ($n=4$) das mulheres que tiveram o parto prematuro e para 54,5% ($n=6$) daquelas cujo parto foi a termo. Entre as puérperas que tiveram o parto prematuro, observamos que a maioria (57,1%) iniciou o pré-natal com adequado estado nutricional, fez uso associado de sulfato ferroso com ácido fólico, deu à luz seu segundo filho e apresentava histórico de prematuridade. No grupo das puérperas que tiveram o parto a termo, 36,4% ($n=4$) encontravam-se com sobrepeso ao iniciar o pré-natal, 45,5% ($n=5$) fizeram suplementação com sulfato ferroso e 45,5% ($n=5$) deram à luz seu primeiro filho.

Dentre as mulheres que tiveram o parto prematuro, 100% o fizeram pela via vaginal, após um intervalo inferior a 2 anos da ocorrência do parto anterior (71,4%). A via vaginal também prevaleceu no grupo de mulheres de parto a termo (81,8%), no qual o intervalo interpartal foi ≥ 2 anos em 45,5% dos casos. A média de peso ao nascimento entre os recém-nascidos de parto prematuro foi de 1700,00g, ao passo que entre os nascidos de termo foi de 3445,45g.

Na tabela 2 observamos que no grupo de puérperas de parto prematuro os valores médios (mg/L) para ferro, cobre, zinco e iodo foram: 0,9967; 0,5058; 4,4158 e 0,4575. No grupo de puérperas de parto a termo, os valores médios (mg/L) para ferro, cobre, zinco e iodo foram: 0,7369; 0,2338; 2,9062 e 0,2685.

Do total de 12 amostras de leite cru de puérperas que tiveram o parto prematuro, 41,7% eram colostro, 33,3% eram leite de transição e 25% eram leite maduro. Já as 13 amostras de leite cru provenientes de puérperas que tiveram o parto a termo ficaram assim estratificadas: 30,8% colostro, 38,5% leite de transição e 30,8% maduro.

A sequência de tabelas, de 3 a 6, descreve a especificação dos elementos ferro, cobre, zinco e iodo nas amostras analisadas, por meio de distribuição percentual das associações destes minerais com biomoléculas presentes nas faixas de diferentes pesos moleculares. À

exceção do iodo, os demais micronutrientes apresentam como principais espécies a associação com biomoléculas dispersas na maior faixa de massa: >600 – 160 KDa.

Na tabela 3, ao analisarmos a especiação do ferro, observamos que entre as amostras do leite proveniente das puérperas que tiveram o parto prematuro, a associação com as proteínas da faixa de 90 – 70 KDa foi a segunda espécie prevalente no colostro (57,62%) e no leite maduro (68,73%). É nesta faixa de massa que encontra-se a lactoferrina. Já no leite de transição, a faixa de 20 – 10 KDa foi a segunda prevalente na formação de espécies do ferro: 10,82%. Na faixa de menor peso molecular (<10 KDa), não foi encontrada formação de espécie do ferro nas amostras do leite das puérperas de parto prematuro, independente da fase de maturação. No grupo de mulheres que tiveram o parto a termo, a faixa com segundo maior percentual de formação de espécies foi a de peso molecular de 20 - 10 KDa, sendo 12,10% no colostro e 9,08% no leite de transição, ao passo que no leite maduro, 17,12% das associações do ferro com biomoléculas foram registradas na faixa de peso molecular 90 - 70 KDa.

A especiação do cobre é apresentada na tabela 4. Entre as puérperas que tiveram o parto prematuro, observou-se que, independente da fase de maturação do leite, as principais distribuições de espécie do cobre dão-se nas faixas de maior peso molecular, onde o micronutriente faz associações com biomoléculas com ação protetora e antioxidante. No caso da associação às imunoglobulinas, os percentuais vão aumentando conforme o leite vai maturando, e em todas as fases foram superiores aos percentuais encontrados no leite das puérperas que tiveram o parto a termo. Foi observado o aumento do percentual de associações do cobre com biomoléculas na faixa 90 - 70 KDa, e diminuição do percentual de associações na faixa de 20 – 10 KDa no leite maduro das puérperas de parto a termo.

A tabela 5 apresenta a especiação do zinco nas amostras analisadas neste estudo. Entre as puérperas de parto prematuro, foi observada a formação de espécies nas faixas de 20 – 10 KDa e de 40 – 30 KDa, em percentuais superiores aos detectados no grupo das mulheres de parto a termo. Já as faixas de massa de 90 – 70 KDa e <10 KDa foram as que menos apresentaram associações entre o zinco e suas biomoléculas.

Com base nos resultados apresentados na tabela 6, percebe-se que, independente da fase de maturação ou do tempo de gestação, nas amostras analisadas neste estudo, o iodo apresentou-se marcadamente sob a espécie considerada inorgânica, ou seja, associado a proteínas de baixo peso molecular. Apenas um pequeno percentual do micronutriente apresentou-se associado a proteínas de grande peso molecular. Nas demais faixas de massa, não foi observada a formação de espécie.

Tabela 1 – Caracterização das puérperas, segundo variáveis sócio-demográficas e obstétricas
(Maternidade Escola/UFRJ, Rio de Janeiro, 2015-2016)

Variável		Mulheres de parto prematuro (n=7)	Mulheres de parto a termo (n=11)
Nível de instrução	Até ensino médio incompleto	28,6%	27,3%
	Ensino médio	42,9%	54,5%
	Ensino superior incompleto	14,3%	---
	Ensino superior	14,3%	18,2%
Ocupação	Trabalha	42,9%	54,5%
	Não trabalha	57,1%	45,5%
Cor da pele	Branças	28,6%	45,5%
	Negras ou pardas	71,4%	54,5%
Fez pré-natal	Sim	100%	90,9%
	Não	---	9,1%
Unidade onde fez o pré-natal	Maternidade Escola da UFRJ	42,9%	27,3%
	Fora da Maternidade Escola da UFRJ	57,1%	63,6%
	Não fez pré-natal	---	9,1%
Intervalo interpartal	≥2 anos	14,3%	45,5%
	<2 anos	71,4%	18,2%
Idade gestacional na data do parto	28s – 30s6d	14,3%	---
	31s – 33s6d	42,9%	---
	34s – 36s6d	42,9%	---
	37s – 38s6d	---	36,4%
	39s – 40s6d	---	63,6%

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Tabela 2 - Caracterização da amostra, segundo níveis de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e iodo (I) (Maternidade Escola/UFRJ, Rio de Janeiro, 2015-2016)

Amostra	Micronutriente (mg/L)	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Leite de mulheres de parto prematuro (n = 12)	<i>Fe</i>	0,9967	1,29010	0,21	4,95
	<i>Cu</i>	0,5058	0,25232	0,29	1,22
	<i>Zn</i>	4,4158	3,07178	1,70	12,92
	<i>I</i>	0,4575	0,27333	0,17	1,22
Leite de mulheres de parto a termo (n =13)	<i>Fe</i>	0,7369	1,16471	0,10	4,56
	<i>Cu</i>	0,2338	0,14128	0,02	0,47
	<i>Zn</i>	2,9062	3,21316	0,18	10,89
	<i>I</i>	0,2685	0,18018	0,04	0,68

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Tabela 3: Especificação de ferro em amostras de leite humano cru segundo distribuição por faixas de peso molecular (Maternidade Escola/UFRJ, Rio de Janeiro, 2015-2016)

Amostra	Faixas de massa (KDa)	Média (%)	Mediana (%)	Desvio padrão (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
Colostro de mulheres de parto prematuro (n = 5)	>600 - 160	57,620	58,000	5,6901	48,7	63,8
	90 - 70	28,060	27,700	5,5931	22,1	37,0
	40 - 30	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	14,320	14,200	1,2276	13,1	16,2
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Leite de transição de mulheres de parto prematuro (n = 4)	>600 - 160	81,175	80,200	3,9677	77,5	86,8
	90 - 70	5,400	5,650	1,9339	2,9	7,4
	40 - 30	2,650	0,000	5,3000	0,0	10,6
	20 - 10	10,825	12,650	7,6448	0,0	18,0
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Leite maduro de mulheres de parto prematuro (n = 3)	>600 - 160	68,733	63,700	17,6953	54,1	88,4
	90 - 70	17,400	19,800	11,8832	4,5	27,9
	40 - 30	5,400	0,000	9,3531	0,0	16,2
	20 - 10	8,333	6,700	9,2587	0,0	18,3
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Colostro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	71,375	76,500	10,9296	55,0	77,5
	90 - 70	10,050	8,750	7,7934	2,0	20,7
	40 - 30	1,825	0,000	3,6500	0,0	7,3
	20 - 10	12,100	13,900	8,6768	0,0	20,6
	<10	3,625	0,000	7,2500	0,0	14,5
Leite de transição de mulheres de parto a termo (n = 5)	>600 - 160	75,540	71,100	7,1210	69,3	83,7
	90 - 70	6,700	5,200	7,3851	0,0	16,9
	40 - 30	8,580	3,500	10,5798	0,0	23,4
	20 - 10	9,080	12,400	8,7182	0,0	19,5
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Leite de maduro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	67,350	70,300	14,9946	47,7	81,1
	90 - 70	17,125	16,400	10,7602	5,7	30,0
	40 - 30	4,525	0,000	9,0500	0,0	18,1
	20 - 10	11,525	11,600	9,8253	0,0	22,9
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Tabela 4 – Especificação de cobre em amostras de leite humano cru segundo distribuição por faixas de peso molecular (Maternidade Escola/UFRJ, Rio de Janeiro, 2015-2016)

Amostra	Faixas de massa (KDa)	Média (%)	Mediana (%)	Desvio padrão (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
Colostro de mulheres de parto prematuro (n = 5)	>600 - 160	72,320	69,000	7,8452	67,2	86,1
	90 - 70	9,960	8,400	5,1091	5,7	18,8
	40 - 30	9,900	9,600	3,1953	6,2	14,8
	20 - 10	3,480	5,3000	3,1933	0,0	6,2
	<10	4,860	5,900	4,6414	0,0	9,5
Leite de transição de mulheres de parto prematuro (n = 4)	>600 - 160	76,100	79,000	9,4509	62,8	83,6
	90 - 70	11,475	7,650	13,2960	0,0	30,6
	40 - 30	1,950	0,000	3,9000	0,0	7,8
	20 - 10	4,025	3,250	4,8169	0,0	9,6
	<10	5,225	5,450	1,5019	3,4	6,6
Leite maduro de mulheres de parto prematuro (n = 3)	>600 - 160	85,333	84,700	4,5829	81,1	90,2
	90 - 70	2,699	0,000	3,8682	0,0	6,7
	40 - 30	2,400	0,000	4,1569	0,0	7,2
	20 - 10	5,433	7,700	4,7269	0,0	8,6
	<10	5,400	4,800	1,2166	4,6	6,8
Colostro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	58,825	57,150	22,4648	35,2	85,8
	90 - 70	21,625	22,150	12,8661	7,4	34,8
	40 - 30	5,875	5,050	6,9163	0,0	13,4
	20 - 10	13,675	10,050	9,3361	7,1	27,5
	<10	2,000	0,000	4,0000	0,0	8,0
Leite de transição de mulheres de parto a termo (n = 5)	>600 - 160	33,260	37,300	8,9265	18,5	40,0
	90 - 70	40,760	44,900	10,1628	28,2	50,8
	40 - 30	12,700	10,800	10,4305	0,0	25,3
	20 - 10	9,460	7,700	2,8945	7,0	13,6
	<10	3,720	3,300	1,6991	2,0	6,2
Leite de maduro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	53,100	49,800	22,7839	32,6	80,2
	90 - 70	31,725	34,600	29,4199	0,0	57,7
	40 - 30	4,650	0,000	9,3000	0,0	18,6
	20 - 10	7,425	8,600	5,6323	0,0	12,5
	<10	2,850	0,000	5,7000	0,0	11,4

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Tabela 5 – Especificação de zinco em amostras de leite humano cru segundo distribuição por faixas de peso molecular (Maternidade Escola/UFRJ, Rio de Janeiro, 2015-2016)

Amostra	Faixas de massa (KDa)	Média (%)	Mediana (%)	Desvio padrão (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
Colostro de mulheres de parto prematuro (n = 5)	>600 - 160	86,500	85,100	5,2745	80,1	94,1
	90 - 70	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	5,340	0,000	7,3429	0,0	14,3
	20 - 10	8,440	6,200	9,1262	0,0	19,2
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Leite de transição de mulheres de parto prematuro (n = 4)	>600 - 160	62,800	62,300	10,3508	51,9	74,7
	90 - 70	1,825	0,000	3,6500	0,0	7,3
	40 - 30	8,050	0,000	16,1000	0,0	32,2
	20 - 10	26,550	31,300	19,3894	0,0	43,6
	<10	0,375	0,000	0,7500	0,0	1,5
Leite maduro de mulheres de parto prematuro (n = 3)	>600 - 160	71,900	73,800	8,6087	62,5	79,4
	90 - 70	2,633	0,000	4,5611	0,0	7,9
	40 - 30	8,733	0,000	15,1266	0,0	26,2
	20 - 10	16,267	20,900	14,5156	0,0	27,9
	<10	0,833	0,000	1,4434	0,0	2,5
Colostro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	88,525	86,600	7,8987	81,7	99,2
	90 - 70	0,775	0,000	1,5500	0,0	3,1
	40 - 30	10,025	11,100	7,6882	0,0	17,9
	20 - 10	0,650	0,000	1,3000	0,0	2,6
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Leite de transição de mulheres de parto a termo (n = 5)	>600 - 160	86,140	89,200	5,7344	76,5	90,1
	90 - 70	2,540	3,000	2,5294	0,0	5,8
	40 - 30	4,140	0,000	9,2573	0,0	20,7
	20 - 10	6,760	8,100	4,4320	0,0	10,5
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0
Leite de maduro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	76,450	81,900	21,1253	47,5	94,5
	90 - 70	0,650	0,000	1,3000	0,0	2,6
	40 - 30	5,525	0,000	11,0500	0,0	22,1
	20 - 10	17,625	7,900	25,0856	0,0	54,7
	<10	0,000	0,000	0,0000	0,0	0,0

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Tabela 6 – Especificação de iodo em amostras de leite humano cru segundo distribuição por faixas de peso molecular (Maternidade Escola/UFRJ, Rio de Janeiro, 2015-2016)

Amostra	Faixas de massa (KDa)	Média (%)	Mediana (%)	Desvio padrão (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
Colostro de mulheres de parto prematuro (n = 5)	>600 - 160	5,560	4,4881	0,0000	0,0	11,2
	90 - 70	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	<10	91,720	97,100	11,5394	73,3	100,6
Leite de transição de mulheres de parto prematuro (n = 4)	>600 - 160	3,275	4,050	2,2470	0,0	5,0
	90 - 70	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	<10	96,000	98,000	5,4772	88,0	100,0
Leite maduro de mulheres de parto prematuro (n = 3)	>600 - 160	3,900	2,500	4,7571	0,0	9,2
	90 - 70	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	<10	96,733	99,600	5,3154	90,6	100,0
Colostro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	2,375	0,250	4,4230	0,0	9,0
	90 - 70	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	<10	96,875	97,600	3,7977	92,3	100,0
Leite de transição de mulheres de parto a termo (n = 5)	>600 - 160	4,780	2,700	5,4815	0,0	11,7
	90 - 70	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	<10	87,220	100,000	18,9468	60,2	101,7
Leite de maduro de mulheres de parto a termo (n = 4)	>600 - 160	3,925	4,800	2,7657	0,0	6,1
	90 - 70	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	40 - 30	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	20 - 10	0,000	0,0000	0,0000	0,0	0,0
	<10	88,850	90,600	12,5152	74,2	100,0

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Discussão

Para determinação dos teores de micronutrientes investigados neste estudo, utilizou-se o ICP-MS para analisar 25 amostras de leite humano cru. De acordo com a tabela 2, no grupo de puérperas que tiveram o parto prematuro foram observados teores médios totais de micronutrientes superiores aqueles encontrados no grupo de puérperas de parto a termo.

Andrade et al, em estudo conduzido em Ribeirão Preto, utilizou o ICP-MS para dosar micronutrientes, dentre eles, ferro, cobre e zinco. Foram analisadas 70 amostras coletadas de mulheres entre 16 e 39 anos, de parto a termo, cujos filhos tinham idade <6 meses e encontravam-se em aleitamento materno exclusivo¹³. Ao compararmos nossos achados com os de Ribeirão Preto, verificamos que, à exceção do ferro, todos os outros valores estavam aumentados, tanto no grupo de mulheres de parto prematuro quanto no de parto a termo. Os valores médios encontrados por Andrade et al foram: 2,65mg/L para ferro, 0,37mg/L para cobre e 2,50mg/L para zinco.

Em estudo conduzido na Austrália, por Mohd-Taufek et al, em 2016, 12 amostras de leite humano foram submetidas ao ICP-MS para realização de dosagem de micronutrientes, dentre os quais encontravam-se ferro, zinco, cobre e iodo. Os valores médios encontrados foram 48µg/L para ferro, 230µg/L para cobre, 1452µg/L para zinco e 119µg/L para iodo¹⁴. Ao convertermos nossos resultados para µg/L, para possibilitar a comparação com o estudo australiano, percebemos que todos os achados novamente encontram-se aumentados, tanto no leite das puérperas de parto prematuro quanto nas de parto a termo. A diferença entre os valores é bastante discrepante, especialmente com relação ao ferro. Em nosso estudo, os valores encontrados nas amostras de leite de mulheres que tiveram parto prematuro foram: 996,7µg/L ferro, 505,8µg/L cobre, 4415,8µg/L zinco e 457,5µg/L iodo. Já nas amostras de leite de mulheres que tiveram o parto a termo encontramos: 736,9µg/L ferro, 233,8µg/L cobre, 2906,2µg/L zinco e 268,5µg/L iodo.

A desigualdade de valores talvez possa ser atribuída ao desenho metodológico do estudo australiano para seleção da amostra: leite coletado em pool de doadoras, pasteurizado em banco de leite com modelo operacional diferente do aplicado pela Rede Global de Bancos de Leite Humano (rBLH). A diferença entre os dois modelos acarreta visões distintas do leite humano, que irão repercutir em diferentes formas de manipulação. Por trabalhar sob a ótica de um alimento funcional, os parâmetros adotados pela rBLH ao longo do processamento, armazenamento e distribuição do leite humano, preservam as particularidades de cada fase do leite¹², o que não ocorre com os outros modelos, que manipulam o leite sob a ótica de secreção humana, o que contribui para perdas nutricionais e de imunobiológicos.

O peso médio de nascimento dos prematuros dados à luz pelas integrantes deste estudo foi de 1770g. Ao utilizarmos como referência as indicações da American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.) e da European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN)¹⁵ para avaliarmos as recomendações nutricionais de ferro, de cobre, de zinco e de iodo, em $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$, observamos que o leite produzido atendia aos requerimentos destes micronutrientes, apresentando níveis adequados para os mesmos.

A sequência de tabelas de 3 a 6 ilustra a especificação dos elementos de interesse deste estudo. Analisando os resultados obtidos, podemos observar que:

- especificação do ferro: conforme demonstrado, a principal espécie do ferro nas amostras estudadas foi a associação estabelecida com as imunoglobulinas, encontradas na faixa de maior peso molecular ($>600 - 160 \text{ KDa}$), tanto no leite das puérperas que tiveram o parto prematuro, quanto naquelas de parto a termo. De acordo com os resultados, pode-se observar que a quantidade total de ferro presente no leite humano, aliada ao perfil de dispersão na formação de espécies, evita que o meio fique saturado de ferro. A distribuição das espécies formadas pela associação do ferro com biomoléculas no leite humano, portanto, favorece a manutenção da capacidade bacteriostática da lactoferrina.

A lactoferrina apresenta papel de destaque entre os componentes do leite humano, devido à sua ação bacteriostática. Trata-se de uma proteína vinculada ao ferro, como demonstrado na especificação, que age na mucosa do prematuro, estimulando sua função imunológica e conferindo proteção contra bactérias, vírus e fungos, sendo que a maior concentração encontrada é no leite humano¹⁶.

Para que a ação bacteriostática da lactoferrina seja preservada, o meio não pode estar saturado de ferro, pois esta proteína tem por função quelar o micronutriente, preservando seu conteúdo e favorecendo sua biodisponibilidade no leite humano. Ao quelar o ferro, a lactoferrina desempenha outra função de proteção para o prematuro: impede que o micronutriente circule livre no sangue, tornando-o indisponível para a utilização pelas enterobactérias, inibindo o crescimento microbiano e diminuindo o risco de infecções do trato digestivo¹⁷.

Em revisão Cochrane 2016¹⁸, concluiu-se que dados sobre a fortificação do leite materno com multinutrientes eram limitados e não forneciam evidências consistentes de que a prática traz benefícios efetivos ao prematuro ao médio e ao longo prazo, exceto um ligeiro aumento das taxas intra-hospitalares de crescimento. Nossos achados fortalecem a recomendação da Cochrane para o uso criterioso dos aditivos, especialmente aqueles que contêm ferro, devido ao risco de saturação do meio e prejuízo à ação bacteriostática da

lactoferrina, conferindo perda de qualidade do leite materno e aumento do risco do prematuro para infecção^{17, 3, 19}.

Os resultados da especiação do ferro demonstraram que, nas amostras das puérperas de parto prematuro, conforme a maturação de colostro até a fase de leite maduro, há um aumento no percentual das associações do micronutriente com as imunoglobulinas, e diminuição do percentual de associações nas faixas onde encontramos a lactoferrina (90 – 70KDa) e a lisozima (20 – 10 KDa). Tal característica parece favorecer tanto a biodisponibilidade do ferro, por impedir sua circulação na forma inorgânica (livre) bem como a atuação sinérgica entre a lactoferrina e a lisozima, importante fator de defesa para o prematuro.

Nas amostras de leite maduro, o padrão de distribuição foi semelhante nos dois grupos; porém, nas amostras das puérperas de parto a termo, o percentual de associações foi menor na faixa das imunoglobulinas e maior na da lactoferrina, sugerindo sintonia com o estágio de desenvolvimento do lactente, no qual a necessidade de incorporação do micronutriente é maior que a de imunoproteção.

Assim como em nosso estudo, a associação a imunoglobulinas foi a principal espécie encontrada no desfecho apresentado por Fernández-Sánchez et al em estudo publicado em 2012, no qual realizaram a especiação do ferro em amostras de leite de 11 puérperas de parto prematuro e 4 de parto a termo, em diferentes fases de maturação⁹.

- especiação do cobre: à exceção do leite de transição das puérperas que tiveram o parto a termo, o percentual de distribuição do cobre foi maior nas associações com as imunoglobulinas, seguido pelas biomoléculas presentes na faixa de 90 – 70 KDa, onde é possível encontrarmos glutathione, enzima com importante papel na redução de agentes oxidantes. Portanto, a especiação do cobre no leite materno sugere uma vantagem adaptativa, pois através das associações que o micronutriente faz com as biomoléculas, parece contribuir para impactar positivamente nos processos imunológicos e antioxidantes no organismo do recém-nascido, especialmente na vigência da prematuridade.

- especiação do zinco: a associação às imunoglobulinas foi marcadamente a principal espécie apresentada pelo zinco, sendo que o percentual decai com o avanço da maturação, tanto no leite das puérperas de parto prematuro quanto de parto a termo. Na faixa de 20 – 10KDa encontra-se a glutathione oxidase, e na faixa de 30 – 40KDa, a superóxido dismutase, que são importantes componentes do sistema antioxidante enzimático, e que são dependentes de zinco e de cobre para seu adequado desempenho²⁰. Nossos achados sugerem que também para o zinco, o perfil de formação de espécies favorece a biodisponibilidade do micronutriente

para ser incorporado aos processos imunológicos e antioxidantes, através de associações com imunoglobulinas, e proteínas na faixa da glutathione oxidase e da superóxido dismutase.

Em estudo publicado em 2016, Fernández-Menéndez et al realizaram a especificação do zinco em amostras de leite de 16 puérperas de parto a termo e de 15 puérperas de parto pré-termo. A análise não apresentou diferenças entre os grupos, e assim como em nosso estudo, a principal espécie observada foi a associação do zinco com imunoglobulinas⁸.

Em estudo conduzido em 2004, St Remy et al desenvolveram metodologia e padrões para a aferição de elementos traço no leite humano, em diferentes estágios de maturação. Para tanto, foi utilizado o soro do leite de mulheres que tiveram parto prematuro. Os tempos de maturação do leite estipulados para coleta das amostras foram colostro, 4º dia pós-parto, 14º dia pós-parto e 28º dia pós-parto, e foi realizada a coleta de 3 amostras individuais para cada fase. A análise foi multielementar, incluindo ferro, cobre, zinco e iodo⁷.

Ao estabelecermos uma comparação entre nossos achados e os de St Remy et al, (2004), podemos observar que:

- especificação do ferro: o estudo de 2004 encontrou o ferro associado principalmente às imunoglobulinas, seguido da associação a compostos de baixo peso molecular. Os autores destacaram ainda, no colostro, a ocorrência de associação com biomoléculas na faixa de 90 – 70 KDa, mais especificamente, 67 KDa, relacionado, provavelmente, à lactoferrina. Em nosso estudo, a maior associação do ferro foi detectada igualmente na faixa das imunoglobulinas. Contudo, no leite das puérperas de parto pré-termo, o percentual encontrado foi maior na fase madura do que na de colostro, em oposição ao resultado proveniente do leite das puérperas de parto a termo.

Ao contrário do estudo de St Remy, no leite das mães prematuras, encontramos a segunda maior associação na faixa de massa na qual se detecta a lactoferrina.

- cobre: ao contrário do nosso estudo, foi observado um decréscimo nos percentuais da faixa de baixo peso molecular (< 10 KDa). No estudo de St Remy et al (2004), houve um aumento acentuado na faixa de alto peso molecular, e os autores acreditaram dever-se à IgA. Em nosso estudo também foi observado aumento no percentual de associações na faixa das imunoglobulinas, conforme a maturação do leite das puérperas de parto pré-termo.

- zinco: o estudo pioneiro descreveu a especificação deste mineral como tendo sido similar em todas as fases do leite, sendo as principais espécies encontradas nas associações com biomoléculas pertencentes às faixas de alto e de baixo peso molecular, respectivamente. Em nossos achados, os principais percentuais de especificação do zinco foram as associações com biomoléculas nas faixas de alto peso molecular e na de 20 – 10 KDa, nesta ordem.

- iodo: os autores ressaltaram que no leite de mulheres que tiveram o parto prematuro, a distribuição do iodo é complexa, com registro de associações na faixa de alto peso molecular. De fato, nossos resultados demonstraram a ocorrência de pequenos percentuais de associação nesta mesma faixa. Contudo, a exemplo da equipe de St Remy⁷, nossos achados apontam que a principal espécie do iodo no leite de puérperas de parto prematuro é a associação a frações não protéicas, de baixo peso molecular, com leve declínio desde colostro até leite maduro.

A análise de especiação evidenciou os padrões de associações de ferro, de cobre, de zinco e de iodo a biomoléculas presentes nas amostras de leite de puérperas de parto prematuro e de parto a termo que integraram este estudo. Por estarem associados às biomoléculas, estes micronutrientes apresentam maior biodisponibilidade, pois, não circulam de forma livre, evitando assim que a quantidade ingerida seja perdida ao longo do processo de digestão.

Os achados corroboram aqueles encontrados na literatura, tanto no que concerne aos valores quantitativos quanto aos qualitativos, e atualizam estudos que são clássicos.

Por meio do emprego da análise de especiação, foi possível demonstrar como as diversas associações de ferro, de cobre, de zinco e de iodo com biomoléculas favorecem a biodisponibilidade destes micronutrientes no leite humano e influenciam positivamente as defesas imunológicas e antioxidantes, especialmente no caso dos prematuros. Sob esta ótica, o estudo poderá colaborar para subsidiar a abordagem qualitativa acerca de micronutrientes e enriquecer a discussão sobre a composição nutricional do leite humano, sensibilizando os profissionais das Unidades de Neonatologia e as próprias instituições onde estão inseridas, a buscar mudanças nas práticas assistenciais, fortalecendo a participação materna como co-terapeuta na recuperação do prematuro.

Como limitação do estudo, apontamos o fato de o mesmo ter sido conduzido em uma única maternidade e o limitado tamanho amostral. Contudo, ressaltamos que a maternidade em questão é uma instituição pública e sua Unidade de Neonatologia é referência para prematuros e recém-nascidos de risco. Com relação ao tamanho amostral, ressaltamos que o mesmo encontra-se em consonância com os estudos correspondentes encontrados na literatura.

Percebe-se que o grupo com menor percentual gerador de resultados foi o de leite maduro de puérperas de parto prematuro. Tal situação pode ser explicada pela dificuldade de acesso à amostra, uma vez que, nesta fase, na maioria dos casos, a mãe já recebeu a alta obstétrica e encontra-se em casa, regressando à unidade durante o dia para visitar seu bebê. O

afastamento físico, por vezes intensificado pela falta de recursos financeiros para permitir visitas diárias, aliado ao cansaço da rotina de idas e vindas à maternidade, a ansiedade, o medo da perda, a tristeza de ter de voltar para a casa sem o seu bebê, são questões que permeiam a rotina diária das mães de prematuros, o que termina por deflagrar o decréscimo da produção de leite²¹.

Estudos futuros devem ser realizados com o emprego da cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) associada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para especificação de outros micronutrientes, como cálcio, fósforo e selênio.

Por fim, recomendamos o leite materno para a nutrição do recém-nascido a termo, pelas vantagens classicamente descritas na literatura e pela oferta de ferro, de cobre, de zinco e de iodo em quantidades adequadas e em espécies que favorecem sua biodisponibilidade, permitindo atender às demandas deste lactente.

Para recém-nascidos prematuros, recomendamos o uso do leite materno como recurso terapêutico para nutrição e adaptação ao meio extra-uterino, tendo em vista que o mesmo fornece ferro, cobre, zinco e iodo em quantidades adequadas e com biodisponibilidade ajustada às particularidades deste grupo, conferindo suporte à demanda nutricional destes micronutrientes e favorecendo os processos imunológicos e antioxidantes.

Referências

- 1 - BAROUKI, R.; GLUCKMAN, P.; GRANDJEAN, P.; HANSON, M.; HEINDEL, J.J. Developmental origins of non-communicable disease: Implications for research and public health. *Environmental Health*, 11:42; 2012. Disponível em <http://www.ehjournal.net/content/11/1/42>. Acesso em: 28/02/2017.
- 2 - VERDUCCI, E.; BANDERALI, G.; BARBERI, S.; RADAELLI, G.; LOPS, A.; BETTI, F.; RIVA, E.; GIOVANNINI, M. Epigenetic effects of human breast milk. *Nutrients*, 6:1711-1724; 2014.
- 3 - JAKAITIS, B. M.; DENNING, P. W. Human breast milk and the gastrointestinal innate immune system. *Clin Perinatol*; 41(2): 423-435. June, 2014.
- 4 - MARTIN, C.R.; LING, P.; BLACKBURN, G. L. Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula. *Nutrients*, v. 8, p. 279, 2016.
- 5 - ZHOU, J.; SHUKLA, V.V.; JOHN, D.; CHEN, C. American Academy of Pediatrics. Human Milk Feeding as a Protective Factor for Retinopathy of Prematurity: A Meta-analysis. *Pediatrics*, v.136, n.6, e1576-e1586; 2015.
- 6 - PRENTICE, P.; ONG, K.K.; SCHOEMAKER, M.H.; TOL, E.A.F.; VERVOORT, J.; HUGHES, I.A.; ACERINI, C.L. Breast milk Nutrient Content and Infancy Growth. *Acta Paediatrica*, 105; 641-647; 2016.

- 7 - St. REMY, R.R. de la F.; FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, M.L.; LÓPEZ SASTRE, J.B.; SANZ-MEDEL, A. Multielemental distribution patterns in premature human milk whey and pre-term formula milk whey by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octopole reaction cell. *J. Anal. At. Spectrom.* 19, p. 1-8. 2004.
- 8 - FERNÁNDEZ- MENÉNDEZ, S.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M.L.; FERNÁNDEZ-COLOMER, B.; ST.REMY, R.R.F.; COTALLO, G.D.C.; FREIRE, A.S.; BRAZ, B.F.; SANTELLI, R.E.; SANZ-MEDEL, A. Total zinc quantification by inductively coupled plasma-mass spectrometry and its speciation by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry in human Milk and commercial formulas: Importance in infant nutrition. *J. Chromatogr. A* 146: 246-254; 2016.
- 9 - FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M.L.; ST.REMY, R.R.F.; IGLESIAS, H.G.; LÓPEZ-SASTRE, J.B.; FERNÁNDEZ-COLOMER, B.; PÉREZ-SOLÍS, D.; SANZ-MEDEL, A. Iron content and its speciation in human milk from mothers of preterm and full-term infants at early stages of lactation: A comparison with commercial infant milk formulas. *Microchemical Journal*, 105:108-114; 2012.
- 10 - REIS, L.S.; GONÇALVES, E.C.B.A. Chemical speciation: an instrument for evaluation of mineral bioavailability. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.45, n.6, p.1126-1132, jun, 2015.
- 11 - MINISTÉRIO da SAÚDE. Amamentação e uso de medicamentos e outras substâncias. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2 ed. Brasília, 2010.
- 12 - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília, 2008.
- 13 - ANDRADE, M.T.S.; DEL CIAMPO, L.A.; DEL CIAMPO, I.R.L.; FERRAZ, I.S.; BARBOSA JUNIOR, F. Breast Milk Micronutrientes in Lactating Mothers from Ribeirão Preto (SP), Brazil. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 1196-1201; 2014.
- 14 - MOHD-TAUFECK, N.; CARTWRIGHT, D.; DAVIS, M.; HEWAVITHARANA, A.K.; KOORTS, P.; SHAW, P. N.; SUMMER, R.; LEE, E.; WHITFIELD, K. The Simultaneous Analysis of Eight Essential Trace Elements in Human Milk by ICP-MS. *Food Anal Methods*; 9:2068-2075; 2016.
- 15 - FINCH, C.W. Review of trace mineral requirements for preterm infants: what are the current recommendations for clinical practice? *Nutrition in Clinical Practice*; 30(1): 44-58, February; 2015.
- 16 – CAMPOS, L.F.; REPKA, J.C.D; FALCÃO, M.C. Effects of Human Milk Fortifier with Iron on the Bacteriostatic Properties of Breast Milk. *J Pediatr (Rio J)*;89:394-9; 2013.
- 17 - QUEIROZ, V.A.O.; ASSIS, A.M.O.; JÚNIOR, H.C.R. Efeito protetor da lactoferrina humana no trato gastrointestinal. *Rev Paul Pediatr*, 31(1): 90-5, Jan/Mar; 2013.
- 18 - BROWN, J.V.E.; EMBLETON, N.D.; HARDING, J.E.; MCGUIRE, W. Multi-nutrient fortification of human milk for preterm infants (review). *Cochrane Library*, 2016.

19 - LÖNNERDAL, B. Bioactive Proteins in Human Milk – Potential Benefits for Preterm Infants. *Clin Perinatol*, 2016.

20 - NOGUEIRA, C.; BORGES, F.; RAMALHO, A. Micronutrientes com Ação Antioxidante em Neonatos. *Rev Paul Pediatr*; 28 (4): 381-6. 2010.

21 - SASSÁ, A.H.; SCHMIDT, K.T.; RODRIGUES, B.C.; ICHISATO, S.M.T.; HIGARASHI, I.H.; MARCON, S.S. Bebês pré-termo: aleitamento materno e evolução ponderal. *Rev Bras Enferm*, 67(4): 594-600, jul-ago; 2014.

ANEXO A - Parecer Consubstanciado

MATERNIDADE ESCOLA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO/ ME-UFRJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise Química de Especificação de Micronutrientes em Leite Materno e Fórmulas Infantis

Pesquisador: Ricardo Erthal Santelli

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 39689814.6.0000.5275

Instituição Proponente: Maternidade-Escola da UFRJ

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 923.381

Data da Relatoria: 18/12/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto prevê o desenvolvimento de estudos analíticos fundamentais e aplicações da análise química de especificação para avaliação da concentração de nutrientes em amostras de leite humano e fórmulas infantis. O estudo inclui um estudo transversal, no qual pretende-se obter leite humano a partir de 30 puérperas adultas atendidas em maternidade pública e escola do Rio de Janeiro, com tempos de lactação diferentes, que doarem uma amostra do seu leite materno, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. A coleta será realizada pela própria puérpera, por meio de ordenha manual, em frasco adequado que será tampado e armazenado sob refrigeração na unidade. Em seguida, as amostras de leite materno serão transportadas sob refrigeração ao laboratório do Instituto de Química/UFRJ, onde será realizada a análise química da concentração total de nutrientes essenciais (Ca, P, Se, Fe, Cu, Zn, I, vitamina A e D) e imunoglobulinas. Também serão obtidas amostras de fórmulas infantis disponíveis no mercado, que também serão analisadas pelo mesmo método e quantificadas em relação aos mesmos elementos que o leite humano.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estabelecer métodos de análise química de especificação para estudar e avaliar a distribuição das

Endereço: Rua das Laranjeiras, 180

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-003

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1556-9747

Fax: (21)1205-9064

E-mail: cep@me.ufrj.br

MATERNIDADE ESCOLA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO/ ME-UFRJ



Continuação do Parecer: 923.381

- Quanto aos benefícios apresentados, retirar os referentes aos benefícios acadêmicos, já que os mesmos não estão contemplados no art. II.4, da Resolução 466/12: "II.4 - benefícios da pesquisa - proveito direto ou indireto, imediato ou posterior, auferido pelo participante e/ou sua comunidade em decorrência de sua participação na pesquisa;"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As observações apresentadas acima nas recomendações não impedem que o projeto seja aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1) De acordo com o item VII.13.d, da Resolução CNS n.º 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios anuais (parciais ou finais, em função da duração da pesquisa).

2) Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada.

RIO DE JANEIRO, 19 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Ivo Basílio da Costa Júnior
(Coordenador)

Endereço: Rua das Laranjeiras, 180
Bairro: Laranjeiras **CEP:** 22.240-003
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)1556-9747 **Fax:** (21)1205-9064 **E-mail:** cep@me.ufrj.br

MATERNIDADE ESCOLA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO/ ME-UFRJ



Continuação do Parecer: 923.381

espécies contendo os elementos essenciais (Ca, P, Se, Fe, Cu, Zn, I) em biomoléculas, bem como as vitaminas A e D e, imunoglobulinas presentes em amostras de leite materno humano e fórmulas infantis, permitindo a comparação entre a composição química do leite materno e as fórmulas infantis, que poderá indicar diferenças na biodisponibilidade dos nutrientes inorgânicos, para o recém-nascido.

Objetivo Secundário:

Descrever a composição química do leite materno de puérperas adultas de parto pré-termo e a termo nas fases de colostro, leite de transição e leite maduro. Descrever as características sócio demográficas, clínicas e da assistência pré-natal das puérperas. Identificar as fórmulas infantis mais utilizadas na prática de puericultura. Desenvolver métodos analíticos para a determinação da concentração total e da especificação dos leites materno e fórmulas infantis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos relacionados à participação das puérperas no estudo são mínimos, tendo em vista que todos os procedimentos adotados para a coleta das amostras de leite humano, são os adotados rotineiramente no Banco de Leite da maternidade estudada, que faz parte da Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (RedeBLH) e do Programa Iberoamericano de Bancos de Leite Humano (Rede IberBLH), e padronizado e recomendado internacionalmente.

Como benefícios do estudo, as nutrizes receberão orientação individualizada quanto ao aleitamento materno e serão sanadas suas dúvidas relacionadas ao processo. Como benefícios à sociedade, o estudo permitirá a melhor caracterização química e o melhor conhecimento da biodisponibilidade dos nutrientes do leite materno humano e de fórmulas infantis, o que poderá ser útil a futuros estudos em nutrição humana de recém-nascidos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de enorme relevância, tanto para o cenário nacional, como internacional, já que busca avaliar a concentração de nutrientes em amostras de leite humano e fórmulas infantis, já que essas últimas são fundamentais para o suporte nutricional dos recém-nascidos que não podem ter acesso ao leite humano.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão presentes e detalhados.

Recomendações:

- Um pequena correção no termo "maternidade pública e escola", pois dá a entender que o projeto será realizado em uma escola.

Endereço: Rua das Laranjeiras, 180

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-003

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1556-9747

Fax: (21)1205-9064

E-mail: cep@me.ufrj.br