UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA SOCIAL

RENATA YUMI NISHIMURA

Influência do teor de ácidos graxos na dieta ao longo da gestação na composição do leite humano maduro

Ribeirão Preto

2013

RENATA YUMI NISHIMURA

Influência do teor de ácidos graxos na dieta ao longo da gestação na composição do leite humano maduro

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Saúde na Comunidade

Orientador: Prof[a]. Dr[a]. Daniela Saes Sartorelli

Ribeirão Preto

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Nishimura, RY

Influência do teor de ácidos graxos da dieta ao longo da gestação na composição do leite humano maduro. Ribeirão Preto, 2013.

88 fls.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde na Comunidade.

Orientador: Sartorelli, Daniela Saes

1. Leite materno. 2. Gestação. 3. Ácidos graxos.

Nome: NISHIMURA, Renata Yumi

Título: Influência do teor de ácidos graxos da dieta ao longo da gestação na composição do leite humano maduro.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, pelo curso de Pós- Graduação em Saúde na Comunidade.

Área de concentração: Saúde na Comunidade

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof[a]. Dr[a]. Daniela Saes Sartorelli

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Assinatura: _____

Prof[a]. Dr[a]. Juliana Stefanelo

Instituição: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto

Assinatura: _____

Prof. Dr. Alexandre Guedes Torres

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Às minhas avós, Teruko Nishimura e Yoshiko Adati que apesar das poucas oportunidades de estudo que tiveram, são exemplos de mulheres e de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que sempre me apoia e incentiva na minhas escolhas profissionais e pessoais, fonte infinita de amor e compreensão.

À Prof. Drª Daniela Saes Sartorelli a qual a tive a honra de ter como minha orientadora desde a graduação, que sempre com muita paciência, incentivo e sabedoria fez com que mais essa etapa fosse possível. Ela será sempre uma amiga, um exemplo de profissional e de pessoa. Eu me sentirei sempre sua cria.

Ao grupo de pesquisa das gestantes, que eu considero uma família, em especial à Patricia Barbieri por sempre me socorrer com a voz da experiência, à Lívia Castro Crivelenti e à Daniela Cristina Candelas Zucolotto, minhas parceiras nesses anos de mestrado, sempre me apoiando, ajudando, torcendo e comemorando a cada passo dado neste período.

Agradeço ao Prof Dr Alceu Jordão Afonso Junior que possibilitou a realização das análises dos ácidos graxos em seu laboratório de pesquisa, além de contribuir intelectualmente para a pesquisa. À Gabriela Ferreira Castro Salim que foi um anjo da guarda ao me socorrer durante as análises cromatográficas e esclarecer muitas dúvidas sempre com muitas paciência e humildade.

À Prof Drª Gleici da Silva Castro Perdoná pelo auxílio nas análises estatísticas mesmo com tantos afazeres.

Ao Lucas Silvestre de Melo pelo apoio, incentivo, paciência, companherismo, amor e carinho durante este processo.

Aos meus amigos, que são a minha família de Ribeirão Preto, com quem dividi minhas alegrias, conquistas e preocupações. Sempre prestativos em ajudar e colaborar no que fosse preciso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) pelo auxílio financeiro à pesquisa.

Aos secretários do Programa de Saúde na Comunidade, Paula e Sérgio, pela paciência, esclarecimento e ajuda durante o mestrado.

Às mães que participaram da pesquisa e doaram seu tempo e leite.

"Quanto mais aumenta nosso conhecimento,

mais evidente fica nossa ignorância"

John F. Kennedy

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação possui uma **Introdução,** que fornece um embasamento científico sobre o tema desenvolvido nos dois manuscritos, seguida da **Justificativa** e **Objetivos**. A **Metodologia,** aborda os aspectos comuns aos dois manuscritos, juntamente com a descrição da análise estatística de cada um deles.

Em seguida, apresentam-se os dois **Manuscritos** que compõem esta dissertação, ambos em português e em formato para submissão. O Manuscrito 1, já foi aceito para publicação no Jornal de Pediatria e o Manuscrito 2 será submetido para publicação após a avaliação e aprovação pela banca.

Nas **Considerações Finais,** juntamente com as **Conclusões** encontram-se as principais contribuições do presente estudo à área de conhecimento.

No final de cada artigo encontra-se as referências bibliográficas utilizadas em cada um e nas **Referências Bibliográficas** no final da dissertação estão os trabalhos citados na Introdução, Metodologia e nos dois manuscritos. Por fim, seguem os **Apêndices e Anexos** referentes ao projeto de pesquisa.

O projeto de pesquisa referente a esta dissertação de mestrado foi aprovado pela Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde-Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

RESUMO

Nishimura RY. Influência do teor de ácidos graxos, na dieta ao longo da gestação, na composição do leite humano maduro [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2013.

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa são de grande importância para o crescimento e o desenvolvimento infantil. Suas concentrações variam amplamente no leite materno, em partes, devido à variabilidade do teor de ácidos graxos da dieta materna. Entretanto a relação entre os ácidos graxos da dieta, durante a gestação, e seus teores no leite materno maduro ainda não foi elucidada. O presente estudo tem como objetivo avaliar a composição de ácidos graxos poli-insaturados do leite materno maduro de mulheres residentes em área distante da costa litorânea do Brasil (Manuscrito 1) e investigar a associação entre a composição de ácidos graxos poli-insaturados da dieta materna, em distintos períodos da gestação e no período pós-parto, na composição destes no leite humano maduro (Manuscrito 2). A presente pesquisa integra as atividades de um estudo prospectivo, conduzido entre 103 gestantes saudáveis, com idade entre 18 e 35 anos, usuárias do Sistema Único de Saúde do município de Ribeirão Preto, SP. O consumo alimentar materno, durante a gestação e após o parto, foi avaliado por meio de três inquéritos recordatórios de 24 horas, ao longo da gestação, e dois inquéritos recordatórios de 24 horas, no puerpério. As mulheres com dados completos de consumo alimentar durante a gestação, que tiveram parto a termo e praticavam aleitamento materno exclusivo ou predominante a partir da 5ª semana pós-parto, foram convidadas a participar do presente estudo. Amostras de 5-10ml de leite materno maduro foram obtidas por meio de ordenha manual, e a dosagem do teor de ácidos graxos se deu por meio de cromatografia gasosa. Para investigação da influência do consumo alimentar de cada trimestre gestacional e no período pós-parto na composição de ácidos graxos poli-insaturados do leite materno maduro, foram utilizados modelos de regressão linear ajustados pelo IMC pós-parto e deatenuados. O Manuscrito 1 descreve a composição de ácidos graxos poli-insaturados do leite materno maduro de mulheres residentes em área distante da costa litorânea do Brasil. Observaram-se baixo teor de ácido docosa-hexaenoico (0,09%) e alta concentração de ácidos graxos *trans* (2,05%), no leite humano das mulheres avaliadas. O

Manuscrito 2 descreve a associação direta entre o teor dos ácidos eicosapentaenoico [β= 1,87 (95% IC: 0,54; 3,28)] e docosa-hexaenoico [β= 0,46 (95% IC 0,21; 0,71)] da dieta materna do terceiro trimeste gestacional e o teor destes no leite humano maduro, assim como a relação direta entre a razão n3/n6 da dieta [β= 0,09 (95% IC 0,02; 0,17)] do segundo e terceiro trimestres gestacionais e no período pós-parto com a proporção verificada no leite materno. Os resultados indicam um baixo teor de ácido docosa-hexaenoico entre as mulheres avaliadas e uma alta concentração de ácidos graxos *trans* no leite materno. O teor de DHA e EPA da dieta materna, no final do período gestacional, pode influenciar a composição de ácidos graxos de leite materno maduro. Ainda, a razão n-3/n-6 de ácidos graxos da dieta materna, no final da gestação e no período pós-parto, também pode influenciar na composição de ácidos graxos do leite materno. Os dados sugerem a relevância de medidas de intervenção para promoção do consumo de alimentos ricos em n-3, no terceiro trimestre gestacional.

Palavras-chave: leite materno, gestação, consumo alimentar, ácidos graxos, lactação.

ABSTRACT

Nishimura RY. Influence of the dietary fatty acids content during pregnancy in the composition of mature breast milk [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2013.

Long-chain polyunsaturated fatty acids play a relevant role on child development and growth. Their content in breast milk vary widely, partially due to the variability of fatty acids content on maternal dietary intake. However little is known about the relationship between maternal dietary intake during pregnancy and the fatty acids content of breast milk. The aim of the present study was to assess the polyunsaturated fatty acids composition of mature breast milk of women living far from the Brazilian coast (Manuscript 1) and to evaluate the influence of the food intake in different periods of pregnancy and postpartum on the polyunsaturated fatty acids composition of mature breast milk (Manuscript 2). This research integrates the activities of a prospective study conducted among 103 healthy pregnant women, aged 18 to 35 years old, users of the Public Health System in Ribeirão Preto, SP. The maternal dietary intake was evaluated by three 24/hour dietary recalls during pregnacy and two 24/hour dietary recalls at the postpartum period. Women with complete data of the dietary intake during pregnancy, who delivered at term, and were exclusively or predominantly breastfeeding their babies after the 5th week postpartum were invited to participate of the present study. Samples of 5 to 10ml of mature breast milk were obtained by manual expression to determine the fatty acids content by gas chromatography. Linear regression models were applied to assess the influence of dietary intake on fatty acids content of mature breast milk, at each trimester of pregnancy and at postpartum period, adjusted by postpartum BMI and deattenuated. The Manuscript 1 describes the polyunsaturated fatty acids composition of mature breast milk of women living far from the Brazilian coast. Among the samples evaluated, low content of docosahexaenoic acid (0,09%) and high level *trans* fatty (2,05%) acid were found. The Manuscript 2 describes a positive association between the eicosapentaenoic acid [β= 1.87 (95% IC: 0.54, 3.28)] and docosahexaenoic acid [β= 0.46 (95% IC 0.21, 0.71)] content of the maternal diet at the third trimester of pregnancy. Moreover, a positive association between the n-3/n-6 dietary ratio [β= 0.09 (95% IC 0.02, 0.17)] at the second

and third trimesters of pregnancy and at the postpartum period with the content of these fatty acids in human milk. Low docosahexaenoic acid and high *trans* fatty acid levels in mature breast milk were found. DHA and EPA content of the maternal diet during late pregnancy might influence the content of these fatty acids on mature breast milk. Moreover, the dietary ratio of n-3/n-6 fatty acids on late pregnancy and post-partum period also influences the fatty acid composition of breast milk. The data suggest the relevance of intervention strategies to promote the intake of food rich in n-3 on late pregnancy.

Keywords: breast milk, pregnancy, dietary intake, fatty acids, lactation.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA	Ácido alfa-linolênico
AGE	Ácidos graxos essenciais
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AGPI-CL	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa
ARA	Ácido araquidônico
CCEB	Critério de classificação econômica do Brasil
CLA	Ácido linoleico conjugado
CSE	Centro Saúde Escola
DHA	Ácido docosa-hexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
IMC	Índice de massa corporal
IR24h	Inquérito recordatório de 24 horas
LA	Ácido linoleico
OMS	Organização Mundial de Saúde
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
UBS	Unidade Básica de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

1.1 Classificação dos ácidos graxos 16

1.2 Papel dos ácidos graxos no desenvolvimento infantil 17

1.3 Determinantes dos ácidos graxos no leite materno 18

1.4 Influência da dieta materna na composição de ácidos graxos no leite humano 19

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES 22

3. OBJETIVOS 23

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS 24

4.1 População e delineamento do estudo 24

4.2 Características demográficas, socioeconômicas e de estilo de vida 26

4.3 Características maternas e do bebê 26

4.4 Avaliação do estado nutricional materno 27

4.5 Estimativa de ácidos graxos pelos inquéritos de 24 horas 27

4.6 Determinação de ácidos graxos no leite materno 28

4.7 Análise dos dados 29

5. MANUSCRITO 1 31

6. MANUSCRITO 2 47

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS 65

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

ANEXOS E APÊNDICES 76

1. INTRODUÇÃO

O leite materno é o melhor alimento a ser oferecido para a criança, nos primeiros meses de vida. Sua oferta só não é recomendada em mães infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outras condições temporárias (Ministério da Saúde, 2004). Além de fornecer os nutrientes necessários ao bebê, atua no desenvolvimento do sistema imunológico (Field, 2005) e na prevenção de doenças na infância e na vida adulta (Robinson; Fall, 2012; Boccolini et al., 2011). Dada a importância do leite materno, a Organização Mundial da Saúde (OMS) assim como o Ministério da Saúde preconizam que a criança seja amamentada de forma exclusiva até os seis meses de idade, sendo a amamentação continuada até os dois anos de vida ou mais, associada a outros alimentos (OMS, 2001; Ministério da Saúde, 2006).

A maturação do leite materno ocorre em três fases: o colostro é secretado em menor volume (2-20 ml por mamada) nos 5 primeiros dias após o parto, é espesso e amarelado, rico em proteínas, sais mineirais e vitaminas lipossolúveis; o leite de transição é secretado em maior volume (30ml por mamada) e rico em lipídios e carboidratos; e o leite maduro, secretado a partir do primeiro mês pós-parto, possui em adequado teor todos os nutrientes necessários ao bebê até o sexto mês de vida (Calil; Falcão, 2003; Ballard; Morrow, 2013).

O leite materno maduro é constituído de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e água, cada 100ml de leite fornece aproximadamente 70kcal (da Silva et al., 2007), sendo que os lipídios fornecem cerca de 40 a 55% das calorias totais deste alimento, além de prover nutrientes essenciais como vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos poli-insaturados (Innis, 2003).

1.1 CLASSIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos podem ser definidos de acordo com o tamanho da cadeia de hidrocarbonos, o grau de insaturação, número e posição destas insaturações e a da classificação dos isômeros das duplas ligações (Vance; Vance, 2008).

Os ácidos graxos saturados não possuem dupla(s) ligação(ões)/ insaturações na cadeia de carbonos, o ácido palmítico é um dos mais abundantes e pode ser encontrado em todos os

organismos. Os ácidos graxos insaturados possuem uma ou mais duplas ligações entre carbonos, denominando-se como monoinsaturados ou poli-insaturados (AGPI), respectivamente (Curi et al., 2009).

As duplas ligações podem ter isômeros *cis* ou *trans*. Na configuração *cis*, os átomos de hidrogênio ligados aos carbonos da dupla ligação estão do mesmo lado na cadeia carbônica, proporcionando uma conformação curva ao ácido graxo. Enquanto na configuração *trans*, os átomos de hidrogênio ligados aos carbonos da dupla ligação estão em lados opostos na cadeia carbônica, conferindo uma forma linear, tornando sua conformação semelhante ao ácido graxo saturado. A configuração *cis* é a forma predominante em que se encontram os ácidos graxos insaturados, já os *trans* estão presentes principalmente em alimentos que sofreram a hidrogenação de gorduras insaturadas, como margarinas, biscoitos, batatas fritas (*fast food*), sorvetes, produtos de panificadora entre outros (Chiara et al., 2003). As carnes e laticínios contêm o ácido linoleico conjugado (CLA) o qual possui duas duplas ligações, sendo uma na configuração *cis* e outra *trans*. Estes ácidos graxos são produzidos de forma natural por ruminantes (Curi et al., 2002).

Pode-se, ainda, classificar os ácidos graxos como essenciais e não essenciais, sendo os essenciais aqueles que não são produzidos pelo organismo, e portanto devem ser obtidos através da dieta ou suplementação. Dentre os ácidos graxos essenciais existem duas subclasses: o n-3 (ômega 3) e o n-6 (ômega 6) que são aqueles em que a primeira dupla ligação está localizada entre o terceiro e quarto carbono e entre o sexto e sétimo carbono, respectivamente, a partir da extremidade oposta à carboxila (Curi et al., 2002).

1.2 PAPEL DOS ÁCIDOS GRAXOS NO DESENVOLVIMENTO INFANTIL

Os lipídios do leite materno são compostos por ácidos graxos saturados e insaturados (Connor, 2000), sendo que os saturados e monoinsaturados são sintetizados no organismo, enquanto os AGPIs, como o ácido graxo linoleico (LA, 18:2 n-6) e α-linolênico (ALA, 18:3 n-3), são essenciais (Innis, 2004).

Os ácidos graxos essenciais (AGE) são precursores dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL), como o ácido araquidônico (ARA, 20:4 n-6), ácido docosa-hexaenoico (DHA, 22:6 n-3) e ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) que possuem um papel importante no desenvolvimento infantil (Koletzko et al., 2001).

O ácido docosa-hexaenoico, encontrado em grande concentração na retina e na massa cinzenta do cérebro, corresponde a 3-5% do peso seco nestes tecidos (Innis, 2003; Innis, 2005) e possui grande relevância no desenvolvimento neuronal e visual infantil (Innis, 2007). O pico de velocidade do crescimento do cérebro humano ocorre no último trimestre gestacional e nos primeiros meses de vida, sugerindo maior vulnerabilidade à deficiência do DHA nesses períodos (Innis, 1991; Georgieff; Innis, 2005).

O ácido araquidônico exerce um papel importante no crescimento infantil, sendo um precursor dos eicosanoides, que por sua vez estão envolvidos em mecanismos fisiológicos como o sistema imunológico e inflamatório (Innis, 2003; Innis, 2005; Innis, 2007; Das, 2006; Calder et al., 2006; Schwab; Serhan, 2006), também possui um papel crítico na sinalização (Innis; Hansen, 1996; Mantzioris et al., 1994; Ponder; Innis, 1992) e divisão celular (Herrera, 2002). Ainda, o DHA e o ARA são importantes componentes estruturais das membranas lipídicas do sistema nervoso central (Innis, 2003).

Há evidências de que o DHA e EPA exerçam uma função importante no sistema imunológico (Miles et al., 2011; Calder et al., 2010), uma vez que estes suprimem a síntese e liberação de fator de necrose tumoral α (TNF-α), atuando como reguladores endógenos negativos da inflamação (Calder, 2001; De Caterina; Basta, 2001).

Dessa forma fica explícita a importância do teor adequado desses ácidos graxos na dieta materna, dado que estes contribuem para o fornecimento de quantidades adequadas dos ácidos graxos de cadeia longa para o leite materno e assim auxiliam no desenvolvimento e crescimento infantil.

Em contrapartida, os ácidos graxos *trans* estão inversamente correlacionados ao peso ao nascer, em crianças nascidas a termo ou pré-termo (Larque et al., 2001), podem interferir nas vias de dessaturação dos ácidos graxos essenciais para os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e prejudicam a síntese de eicosanoides e a função das membranas em decorrência da conversão em ácidos graxos isoméricos não usuais de cadeia longa n-6 e n-3 (Tinoco et al., 2008; Innis, 2006).

1.3 DETERMINANTES DO TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE MATERNO

A composição de ácidos graxos do leite materno pode ser influenciada por alguns fatores como: maturação do leite (Chen et al., 1997; Luukkainen et al., 1994; Genzel-Boroviczeny et al., 1997; Rueda et al., 1998), idade gestacional (Luukkainen et al., 1994; Genzel-Boroviczeny et al., 1997), estado nutricional materno (Marín et al., 2005; Mäkelä et al., 2012) e dieta materna (Rocquelin et al., 1998; Harzer et al., 1984).

Estudos prospectivos demonstram que, ao longo da maturação do leite, o teor de LA e ALA aumenta, enquanto o teor de AGPI-CL tende a diminuir durante o primeiro mês, após o parto (Chen et al., 1997; Luukkainen et al., 1994; Genzel-Boroviczeny et al., 1997; Rueda et al., 1998).

A idade gestacional no parto também influencia o teor de ácidos graxos no leite. O leite materno de mães de crianças nascidas pré-termo possui maiores teores de AGPI-CL (Luukkainen et al., 1994) e ácidos graxos de cadeia média e intermediária (Genzel-Boroviczeny et al., 1997), quando comparado ao leite de mães que tiveram o parto a termo.

Um estudo prospectivo, realizado com 144 mulheres finlandesas, verificou que o leite maduro de mulheres com sobrepeso possui maior teor de ácidos graxos saturados, maior razão n-6/n-3, menor teor de n-3 e menor razão de insaturados/saturados, quando comparado ao leite de mulheres eutróficas (Mäkelä et al., 2012). Marín e colaboradores, 2005, observaram maior teor de LA, total n-6 e total de poli-insaturados no leite de mulheres argentinas com sobrepeso, quando comparado ao leite de eutróficas, indicando que o estado nutricional materno também influencia o teor de ácidos graxos do leite (Marín et al., 2005).

1.4 INFLUÊNCIA DA DIETA MATERNA NA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE HUMANO

A composição de teor dos ácidos graxos no leite materno varia amplamente, em especial o teor de DHA. Concentrações de DHA no leite humano, verificadas em estudos prévios, variaram entre 0,09% (Schmeits et al.,1999) e 1,1% (Wang et al., 2000). Os discrepantes teores dos AGPI-CL n-3, no leite de mulheres de diferentes países, podem estar relacionados à disponibilidade dos alimentos fontes destes ácidos graxos, especialmente peixes gordurosos, como sardinha e salmão.

Estudos prévios verificaram que o leite de mulheres de países com dieta típica ocidental (rico em alimentos fontes de gordura saturada e poli-insaturadas n-6) possui

menores teores de AGPI-CL n-3, quando comparado ao teor no leite de mulheres com consumo mais frequente de peixes, como no Japão (Wang et al., 2000) e Suécia (Xiang et al., 2005).

O teor de *trans* no leite materno também está associado ao teor deste ácido graxo da dieta materna. Mulheres de países como Estados Unidos e Canadá, que apresentam um alto consumo de alimentos industralizados, possuem teores mais elevados de *trans* no leite (7,2% e 5,3%, respectivamente) quando comparado ao teor em leite de mulheres no Brasil (2,19%) (Tinoco et al., 2007), África (1,2%) (Koletzko et al., 1991) e França (2%) (Chardigny et al., 1995).

Ensaios clínicos controlados aleatorizados demonstraram que o consumo de peixes gordurosos e o uso de suplementos de AGPI-CL n-3 no puerpério resultaram em um impacto positivo no teor de EPA e DHA no leite materno (Fidler et al., 2000; Jensen et al., 2000; Makrides et al., 1996).

A suplementação durante o período pós-parto, de diferentes fontes de DHA (alga, ovo ou óleo marinho) em 24 mulheres americanas, ocasionou um aumento de 32-91% no teor de DHA no leite materno (Jensen et al., 2000).

Estudos sugerem que a dieta na gestação também interfere no teor de ácidos graxos do leite humano, em especial no teor de AGPI-CL n-3. Um ensaio clínico controlado aleatorizado, conduzido com 123 mulheres do Reino Unido, verificou que após a ingestão de duas porções de salmão por semana, a partir da 20ª semana gestacional até o parto, o teor de EPA e DHA foi 80% e 90% maior, respectivamente, em relação ao grupo controle (Urwin et al., 2012).

Estudos recentes sugerem uma relação direta entre o uso de suplemento de n-3 no segundo e terceiro trimestres gestacionais no seu teor, no leite materno maduro (Dunstan et al., 2007; Imhoff-Kunsch et al., 2011). Entretanto, os resultados do impacto do uso do suplemento durante a gestação na concentração de EPA e ácido α-linolênico são inconsistentes (Dunstan et al., 2007; Imhoff-Kunsch et al., 2011).

A suplementação do ARA realizada por longo período (≥ 8 semanas no pós-parto ou desde o segundo trimestre gestacional até a 12ª semana pós-parto) também resulta em um aumento deste ácido graxo no leite materno (van Goor et al., 2009; Weseler et al., 2008).

Entretanto, um estudo utilizando isótopos marcados em seis lactantes alemãs estimou que apenas 30% do teor do ácido graxo linoleico do leite materno é decorrente do consumo alimentar, sugerindo que o estoque materno e/ou a dieta ao longo da gestação sejam fatores preditores da composição lipídica do leite materno maduro (Demmelmair et al., 1998).

Diversos ensaios clínicos controlados aleatorizados foram conduzidos, utilizando a suplementação de AGPI-CL n-3 e n-6 no período gestacional ou pós-parto, demonstrando efeitos distintos no teor de ácidos graxos do leite materno (Dunstan et al., 2007; Imhoff-Kunsch et al., 2011; Jensen et al., 2000; Makrides et al., 1996; van Goor et al., 2009; Weseler et al., 2008; Smit et al., 2000). Porém são escassos os estudos realizados que verificaram a influência dos ácidos graxos da dieta durante a gestação na composição lipídica do leite materno. Nestes, somente a dieta no terceiro trimestre gestacional foi avaliada (Peng et al., 2009; Mäkelä et al., 2012).

A influência do teor de ácidos graxos da dieta materna em relação ao leite humano pode variar segundo o período gestacional, visto que há diferenças na velocidade do transporte dos ácidos graxos através da placenta e no metabolismo materno e fetal em cada estágio gestacional (Haggarty, 2004).

Dessa forma, são fundamentais investigações sobre a relação da dieta materna ao longo do período gestacional e a composição de ácidos graxos poli-insaturados do leite materno.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Dada a relevância da oferta adequada dos ácidos graxos poli-insaturados para o adequado desenvolvimento infantil e visto que o teor destes ácidos graxos no leite humano sofrem influência da dieta materna e de seus estoques corporais, estudos que visem a elucidar esta relação são de grande importância.

Sugere-se que o leite humano de mulheres residentes em distintas regiões geográficas do país, com acesso diferenciado aos alimentos fontes de AGPI-CL n-3, possa variar quanto ao teor destes ácidos graxos. Ainda, em 2006, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através da Resolução RDC n°360/2003, tornou obrigatória a declaração do teor de *trans* nos rótulos dos alimentos. O que pode ter influenciado as indústrias alimentícias a produzirem alimentos com redução nos teores de *trans*, levando a um menor consumo materno e à concentração no leite humano. Porém nenhum estudo brasileiro foi conduzido após essa medida.

Também são escassos os estudos que investigaram a influência da dieta materna, ao longo da gestação, na composição de ácidos graxos do leite materno maduro.

As hipóteses do presente estudo são de que o teor de EPA e DHA no leite de mulheres que residem distante da costa seja inferior ao verificado em estudos conduzidos entre mulheres que habitam em região litorânea, devido ao distinto acesso ao consumo de peixes. Também espera-se que o teor de ácidos graxos *trans* no leite das mulheres seja inferior ao observado em estudos conduzidos previamente à Resolução RDC n°360/2003, dado que grande parte dos produtos industrializados no país declara isenção de ácidos graxos *trans* nos rótulos de alimentos, após esta medida legislativa.

Outra hipótese testada é de que existam diferentes associações entre o teor de ácidos graxos da dieta materna de distintos trimestres gestacionais com o teor de ácidos graxos no leite materno maduro, dada que a velocidade do transporte de ácidos graxos pela placenta e a formação de estoques corporais maternos em cada período gestacional são variáveis.

3. OBJETIVOS

- Avaliar a composição de ácidos graxos do leite humano maduro de mulheres residentes em área distante da costa litorânea do Brasil.

Manuscrito 1: Composição de ácidos graxos do leite materno em mulheres residentes em área distante da costa litorânea do Brasil

- Verificar a influência do consumo alimentar materno, em diferentes períodos da gestação e no período pós-parto, na composição de ácidos graxos poli-insaturados no leite humano maduro.

Manuscrito 2: A influência da composição de ácidos graxos poli-insaturados na dieta, ao longo da gestação, na composição do leite materno maduro

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS:

4.1 População e delineamento do estudo

O presente estudo integra as atividades do projeto de pesquisa "Desenvolvimento, validação e reprodutibilidade de um questionário quantitativo de frequência alimentar para gestantes", desenvolvido com o objetivo de avaliar a precisão do questionário na avaliação de consumo alimentar habitual de gestantes usuárias de Unidades Básicas de Saúde de Ribeirão Preto, SP.

A amostra do estudo foi de conveniência, sendo composta por 103 gestantes adultas, atendidas em Unidades Básicas de Saúde do município de Ribeirão Preto, SP. A coleta de dados foi realizada em cinco Unidades Básicas de Saúde (UBS), segundo a localização e demanda: UBDS "Dr. Ítalo Baruffi" - Castelo Branco (região leste), UBS "Waldemar Barnsley Pessoa" - Parque Ribeirão Preto (região sul), Centro de Saúde-Escola (CSE) Dr. Edgard Ache - Ipiranga (região oeste), UBDS "Dr. Marco Antônio Sahão" - Vila Virgínia (região sul) e UBS "Wilma Delphina de O. Garotti" (região central).

Os critérios de inclusão do estudo prospectivo foram: Índice de Massa Corporal (IMC) pré-gestacional entre 18,5 e 24,9 Kg/m² (OMS, 2003), idade entre 18 anos e 35 anos e ausência de diabetes gestacional, cardiopatias, nefropatias ou hipertensão arterial (Apêndice A).

Cada indivíduo participou de três avaliações durante a gestação (uma em cada trimestre gestacional), sendo estas realizadas no momento da consulta de pré-natal na UBS frequentada pela gestante ou em visita domiciliar. As entrevistas foram realizadas por nutricionistas previamente treinados. Os dados obtidos em cada avaliação foram:

- 1º trimestre (até 14ª semana gestacional): obtenção de dados demográficos, de estilo de vida e socioeconômicos, aferição do peso e altura e obtenção do inquérito recordatório de 24 horas (IR24h).
- 2º trimestre (entre a 14ª e 24ª semana gestacional): aferição do peso e obtenção do IR24h.
- 3º trimestre (a partir da 24ª semana gestacional): aferição do peso e obtenção do IR24h.

Um segundo IR24h foi obtido de uma subamostra de 30 gestantes por meio de contato telefônico, em cada trimestre gestacional, para fins de correção da variabilidade intraindividual.

Das 103 gestantes avaliadas no estudo prospectivo, entre setembro de 2009 e maio de 2010, 75 possuíam três IR24h obtidos ao longo da gestação, sendo convidadas a participar do presente estudo, entre maio de 2010 e março de 2011.

Os critérios de inclusão do presente estudo foram: mães que tiveram parto a termo (a partir de 37ª semana gestacional) e que praticavam aleitamento materno predominante (ingestão de leite materno e outros líquidos à base de água) ou exclusivo (ingestão somente de leite materno, sem nenhum outro alimento líquido ou sólido), a partir da quinta semana pós-parto (Apêndice C).

No período pós-parto, aquelas que se enquadraram nos critérios e aceitaram participar do presente estudo, foi agendada uma visita domiciliar ou no posto de saúde, na qual foram obtidas informações referentes ao parto e aos dados da mãe e do bebê, também se obteve um IR24h e foi entregue à mãe um recipiente para que ela pudesse coletar o leite posteriormente.

Foi agendado um dia para que o leite fosse coletado pela própria mãe em domicílio, mantendo este em freezer/congelador até ser transportado e congelado no mesmo dia, no Laboratório de Nutrição e Metabolismo.

Com o mínimo de uma semana após a obtenção do primeiro IR24h no período pós-parto, foi obtido um segundo IR24h por meio de contato telefônico.

Na Figura 1, encontra-se o fluxograma da coleta de dados do estudo.

As participantes concordaram em participar de ambos os estudos. mediante a assinatura dos Termos de Consentimento após receberem informações sobre os estudos (Apêndices E e F).

A execução do estudo prospectivo, assim como do presente estudo, foi aprovada pela Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto (Anexos A e B) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde-Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (Anexos C e D).

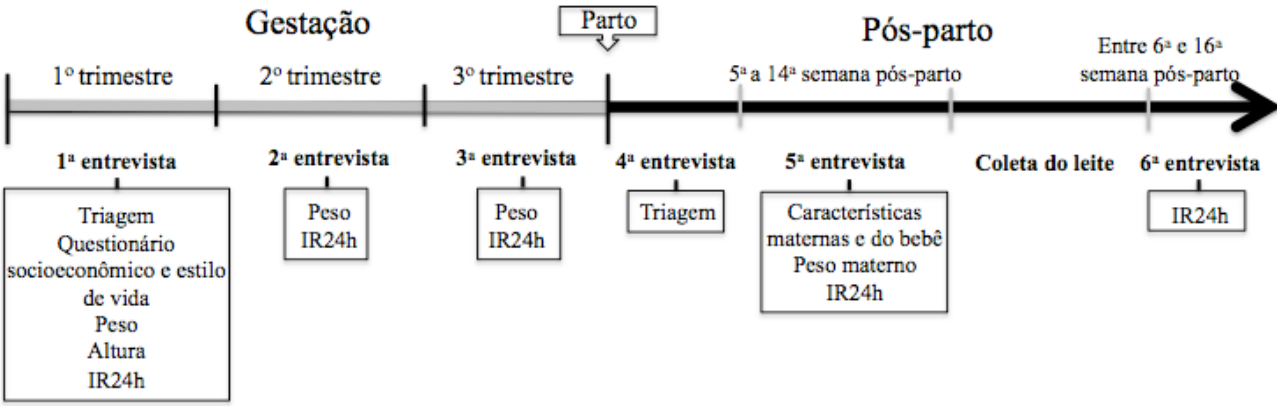

Figura 1. Fluxograma da coleta de dados. Ribeirão Preto, 2009-2011.

4.2 Características demográficas, socioeconômicas e de estilo de vida

Dados de idade, escolaridade, cor de pele, condição socioeconômica, estilo de vida e presença de morbidades foram obtidos por meio de questionário estruturado na primeira avaliação do estudo **(**Apêndice B**)**. Para a classificação econômica, utilizou-se o Critério de Classificação Econômica Brasil (CCEB), que permite estratificar a população em oito classes econômicas, baseando-se nas respostas do entrevistado quanto à posse de bens, presença de empregada mensalista e grau de instrução do chefe da família. A classificação em pontos permite inferir-se sobre a renda familiar média (Associação Brasileira de Empresa de Pesquisas, 2008).

4.3 Características maternas e do bebê

Informações sobre idade gestacional no parto, tipo de parto, prática do aleitamento materno exclusiva ou predominante e oferta de alimentos ao bebê foram obtidas por meio de questionário estruturado aplicado em contato telefônico e durante a visita domiciliar ou na UBS frequentada pela participante (Apêndices C e D) .

Informação e dados antropométricos do bebê como: peso e comprimento ao nascer e nas consultas de puericultura, foram obtidos preferencialmente do cartão da criança ou questionados à mãe.

4.4 Avaliação do estado nutricional materno

O dado de peso pré-gestacional foi obtido por autorrelato ou o peso registrado em prontuário obtido na primeira consulta de pré-natal.

O peso em cada trimestre gestacional e no pós-parto foi aferido por meio de balança eletrônica digital (Plenna, modelo MEA 07700, São Paulo, Brasil), com capacidade de 150kg e graduação de 100g. Dados de altura foram obtidos na primeira avaliação, utilizando-se régua antropométrica de balança antropométrica (Cauduro, modelo 101PL, Cachoeira do Sul-RS, Brasil).

Para avaliação do estado nutricional, foi calculado o IMC, na qual foram empregadas as medidas de peso e estatura aferidas nas gestantes. Os critérios do *Institute of Medicine* (Institute of Medicine, 2009) foram empregados para a avaliação da adequação de ganho de peso gestacional. E o critério utilizado para classificação do estado nutricional pré-gestacional e no pós-parto foi o proposto pela OMS (World Health Organization, 2003).

Para o cálculo da idade gestacional, foi empregada preferencialmente a data da última menstruação registrada em prontuário, posteriormente comparada aos dados da ultrassonografia realizada até a vigésima semana gestacional.

O ganho de peso, durante a gestação, foi calculado pelo peso obtido na última entrevista do estudo prospectivo (terceiro trimestre) subtraído do peso pré-gestacional.

4.5 Estimativa de ácidos graxos pelos inquéritos recordatórios de 24 horas

Para avaliação do consumo alimentar, foi obtido um IR24h em cada trimestre gestacional, e em subamostra de 30 mulheres um segundo recordatório foi coletado por telefone, para fins de correção da variabilidade intraindividual. Os IR24h suplementares foram obtidos por contato telefônico (Fox et al., 1992).

No pós-parto, foram obtidos dois IR24h, sendo um no momento da visita domiciliar e o segundo por contato telefônico, com pelo menos uma semana de diferença entre os 2IR24h.

A obtenção dos inquéritos recordatórios foi realizada por meio da técnica de "passagens múltiplas". Este método consiste no levantamento do consumo de alimentos em três fases: listagem rápida, descrição detalhada e revisão. Na primeira etapa, o entrevistado deve listar, não necessariamente em ordem cronológica e sem interrupções do entrevistador, todos os alimentos consumidos no dia anterior. Na segunda etapa, devem ser obtidas informações sobre alimentos inicialmente omitidos, ou outros que devem ser adicionados ao inquérito recordatório assim como as quantidades de todos os alimentos citados, e por último devem ser checadas com o entrevistado todas as informações obtidas, com o objetivo de completar o relato (Johnson et al., 1998).

A codificação do tamanho das porções (transformação de medidas caseiras referidas em médias de consumo), assim como a digitação dos IR24h, foi realizada por um nutricionista treinado. Para a padronização da equivalência de medidas caseiras em gramas de consumo, foram empregados manuais de receitas e medidas caseiras desenvolvidos no Brasil (Fisberg; Slater, 2002; Pinheiro et al., 2005; Tomita; Cardoso, 2000).

Para a análise da Composição Nutricional dos recordatórios, foi utilizado o Programa NutWin® (NutWin Software, Programa de Apoio à Nutrição, Versão 1.5, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil, 2002), empregando a Tabela de Composição Química dos Alimentos-TACO (Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação, 2006) e na ausência de dados sobre a composição química de algum alimento foi utilizada a tabela da *United States Department of Agriculture* - USDA (United States Department of Agriculture, 2001).

4.6 Determinação de ácidos graxos do leite materno

Amostras de 5-10ml de leite materno maduro posterior foram obtidas por ordenha manual, imediatamente após a primeira mamada do bebê e antes do desjejum da mãe. As amostras foram imediatamente congeladas a -20C e armazenadas a -80°C em tubos estéreis até análise.

O teor de ácidos graxos do leite foi determinado no laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Para esta análise, alíquotas de 0,8ml foram utilizadas para a extração da gordura através do método de Bligh e Dyer e metiladas com hidróxido de potássio em metanol a 0,5M (Bligh; Dyer, 1959).

Os ésteres metílicos de ácidos graxos do leite humano foram determinados por cromatografia gasosa, utilizando o cromatógrafo gasoso SHIMADZU, GC-2014 (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany) equipado com autoinjetor AOC-20i (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany), com coluna capilar de polietileno glicol – Supelcowax 10 (30 metros de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno; 0,25µm de espessura do filme; Supelco Inc., Bellefonte, PA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo de 1,0ml/min. O ar sintético foi utilizado para a ionização em chama com detecção a 280ºC. As injeções de 1µl de amostras foram realizadas em modo split. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C.

O padrão para identificação utilizado foi composto por um mix de ésteres metílicos de ácidos graxos da Supelco (Supelco 37 Component FAME Mix; Supelco Inc., Bellefonte, PA) com adição dos padrões de 9c,11t-CLA e 10t,12c-CLA. A coluna utilizada separa os isômeros de CLA em quatro grupos: *cis,trans; trans,cis; cis,cis; trans,trans*. Desta forma o ácido linoleico 10t, 12c-CLA pode ter co-eluído com o 7t, 9c-CLA. A quantificação foi feita por normalização de área, e os resultados estão apresentados em porcentagem por peso. Exemplo de um cromatograma de leite humano coletado e tabela para sua interpretação (Apêndice G).

4.7 Análise dos dados

No Manuscrito 1, foram obtidos a média e o desvio-padrão (DP) para variáveis contínuas e frequência de variáveis categóricas.

No Manuscrito 2, utilizaram-se modelos de regressão linear empregando-se o teor de ácidos graxos do leite materno como variável dependente e os ácidos graxos da dieta materna como as variáveis independentes. Modelos lineares univariados e múltiplos ajustados pelo IMC pós-parto e deatenuados foram explorados.

Para a deatenuação, que consiste na correção do coeficiente de regressão linear pelo erro da variabilidade intra e interpessoal, foi utilizada a fórmula: $b_t = b_o$ [1 + (σ intra/ σ inter)/n^o IR24h] (Beaton et al., 1979).

Onde b_t é o verdadeiro coeficiente de regressão, b_o é o coeficiente de regressão observado e as variâncias intra e interindividual foram obtidas através das análises de variância ANOVA.

As variáveis independentes testadas em relação ao teor de ácidos graxos no leite, foram: idade, renda familiar, anos de estudo, classe econômica, cor de pele, consumo de bebida alcóolica, tabagismo, atividade física, IMC pré-gestacional, IMC pós-parto, semana gestacional no parto, ganho de peso gestacional, peso e comprimento ao nascer do bebê, porém destas somente o IMC pós-parto foi significante e, portanto, ajustado aos modelos.

O número de dias, entre a obtenção dos IR24h na gestação e no pós-parto, e a coleta do leite também foram testados no modelo de regressão linear, porém não houve significância.

Também foram calculados a média e o desvio-padrão da estimativa de ácidos graxos da dieta em cada trimestre gestacional e no período pós-parto e no leite materno maduro e para variáveis contínuas e frequência de variáveis categóricas.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SPSS (SPSS Software, Versão 17.0, SPSS Inc. Woking, Surrey, UK).

5. MANUSCRITO 1

Composição de ácidos graxos do leite materno em mulheres residentes em área distante da costa litorânea do Brasil

Fatty acid content in breast milk of Brazilian women living far from the coast of Brazil

Teor de ácidos graxos do leite materno maduro

Renata Y. Nishimura[1], Gabriela S. F. de Castro[2], Alceu A. Jordão Junior[3], Daniela S. Sartorelli[4]

[1]Pós-Graduação em Saúde na Comunidade da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP). [2]Pós-Graduação em Clínica Médica da FMRP, USP. [3]Departmento de Clínica Médica da FMRP, USP. [4]Departmento de Medicina Social da FMRP, USP.

Artigo aceito para publicação no Jornal de Pediatria

6. MANUSCRITO 2

A influência da composição de ácidos graxos poli-insaturados na dieta ao longo da gestação na composição do leite materno maduro

Influence of the dietary polyunsaturated fatty acids composition during pregnancy in the composition of mature breast milk.

Renata Y. Nishimura[1], Patricia Barbieiri[1], Gabriela S. F. de Castro[3], Alceu A. Jordão Junior[4], Gleici da Silva Castro Perdoná[5], Daniela S. Sartorelli[5]

[1]Pós-Graduação em Saúde na Comunidade da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP). [2]Pós-Graduação em Saúde na Comunidade da FMRP, USP. [3]Pós-Graduação em Clínica Médica da FMRP, USP. [4]Departmento de Clínica Médica da FMRP, USP. [5]Departmento de Medicina Social da FMRP, USP.

Resumo

Objetivo: verificar a influência do consumo alimentar materno em diferentes períodos da gestação na composição de ácidos graxos poli-insaturados, no leite humano maduro.

Métodos: Um estudo prospectivo foi conduzido entre 45 gestantes, com idade entre 18-35 anos, que tiveram parto a termo e praticavam aleitamento materno exclusivo ou predominante. Amostras de leite materno maduro foram coletadas a partir da 5ª semana pós-parto por meio de ordenha manual, e a composição de ácidos graxos do leite foi determinada por cromatografia gasosa. O consumo alimentar, durante a gestação, foi estimado através de três inquéritos recordatórios de 24 horas (IR24h), um em cada trimestre gestacional, e dois IR24h no período pós-parto. Modelos de regressão linear foram utilizados para verificar a associação entre a estimativa de ácidos graxos da dieta materna em cada trimestre gestacional e o teor de ácidos graxos do leite humano maduro.

Resultados: verificou-se associação positiva entre o teor de EPA (β= 1,873; IC=0,543; 3,283) e DHA (β= 0,464; IC=0,212; 0,714) da dieta materna no terceiro trimestre gestacional e entre a razão n3/n6 (β= 0,093; IC=0,016; 0,170) na dieta do segundo e terceiro trimestres gestacionais, assim como no período pós-parto, com o teor destes ácidos graxos no leite materno maduro.

Conclusões: o teor de DHA e EPA da dieta materna, durante o final do período gestacional, podem influenciar na composição de ácidos graxos de leite materno maduro. Ainda, a razão n-3/n-6 de ácidos graxos, da dieta no final da gestação e no período pós-parto, pode também influenciar na composição de ácidos graxos do leite materno.

Abstract

Objective: to evaluate the influence of the food intake in different periods of pregnancy in the composition of polyunsaturated fatty acids of mature breast milk.

Methods: Prospective study conducted among 45 pregnant women, aged 18-35 years who delivered at term, and were exclusively or predominantly breastfeeding their babies. Samples of mature breast milk were collected after the 5th week post partum by manual expression and the fatty acid composition of the milk was determined by gas chromatography. Food intake during pregnancy was evaluated by three food recalls (24hR), one in each trimester of pregnancy and by two 24hR at the post-partum period. Linear regression models were used to verify the association between the content of human milk fatty acids and the maternal dietary fatty acids in each trimester of pregnancy.

Results: a positive association between EPA (β= 1.873; IC=0.543, 3.283) and DHA (β= 0.464; IC=0.212, 0.714) content of the maternal diet from the third trimester of pregnancy and the diet ratio n-3/n-6 (β= 0.093; IC=0.016, 0.170) of the second and third trimesters of pregnancy and in the post-partum period with the amount of these fatty acids in mature breast milk were found.

Conclusion: DHA and EPA content of the maternal diet during late pregnancy might influence the content of these fatty acids on mature breast milk. Moreover, the dietary ratio of n-3/n-6 fatty acids on late pregnancy and post-partum period on fatty acid composition of breast milk.

Key words: mature breast milk, food intake, fatty acids, pregnancy, n-3, n-6

Introdução

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL), como o ácido docosa-hexaenoico (DHA, 22:6n-3), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e ácido araquidônico (ARA, 20:4n-6), são de grande importância no crescimento e desenvolvimento infantil (1). O teor desses ácidos graxos no leite humano, em especial o DHA, varia amplamente (2, 3), possivelmente em decorrência da diversidade do consumo alimentar e do teor desses ácidos graxos da dieta materna, em distintas regiões.

Ensaios clínicos sugerem que consumo de peixes gordurosos e o uso de suplementos de óleo de peixe no puerpério estão associados a um aumento do teor de EPA e DHA no leite materno. Entretanto, em estudos que empregaram isótopos marcados, verificou-se que apenas 30% da variabilidade do teor de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) do leite materno é explicada pela dieta no puerpério (4).

Ensaios clínicos aleatorizados controlados sugerem uma relação direta entre o uso de suplemento de n-3 no segundo e terceiro trimestres gestacionais no seu teor, no leite materno maduro (5, 6). Entretanto, os resultados do impacto do uso do suplemento, durante a gestação na concentração de EPA e ácido α-linolênico (ALA), são controversos (5, 6).

Diversos estudos foram conduzidos utilizando a suplementação de n-3 e n-6 AGPI-CL no período gestacional ou pós-parto, demonstrando distintos efeitos no teor de ácidos graxos do leite materno (5-11). São escassos os estudos que verificaram a influência dos ácidos graxos da dieta, durante a gestação, na composição lipídica do leite materno. Nestes, a avaliação do consumo alimentar foi restrita ao terceiro trimestre de gestação (12, 13).

A relação entre os ácidos graxos da dieta materna e o teor destes no leite humano poderão diferir segundo o período de exposição, dadas as oscilações na velocidade do transporte destes pela placenta e no metabolismo materno em cada estágio da gravidez (14). Entretanto, esta hipótese não foi testada em estudos prévios. O objetivo do presente estudo é verificar a influência do consumo alimentar, em diferentes períodos da gestação, na composição de ácidos graxos poli-insaturados no leite materno maduro.

Materiais e Métodos

População de estudo

Um estudo prospectivo foi conduzido entre 103 gestantes, usuárias de Unidades Básicas de Saúde de Ribeirão Preto, com idade entre 18 e 35 anos, eutróficas no período pré-gestacional e com ausência de doenças que alterem o consumo alimentar habitual (diabetes mellitus, hipertensão arterial), com o objetivo de testar a acurácia de um questionário quantitativo de frequência alimentar. Destas, 75 possuíam três inquéritos recordatórios de 24 horas (IR24h) ao longo da gestação, sendo convidadas a participar do presente estudo.

Os critérios de inclusão do presente estudo foram: mulheres que praticavam o aleitamento exclusivo (ingestão somente de leite materno, sem nenhum outro alimento líquido ou sólido), ou predominante (ingestão de leite materno e outros líquidos à base de água) a partir da 5ª semana pós-parto e mães que tiveram o parto a termo (a partir da 37ª semana gestacional).

O estudo foi aprovado pela Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde-Escola da FMRP, USP (Protocolo nº 378/CEP-CSE/FMRP-USP).

Características sociodemográficas e estilo de vida

Para obtenção de dados sobre idade, escolaridade, posse de bens e cor da pele foi utilizado um questionário estruturado aplicado na primeira entrevista do estudo prospectivo (primeiro trimestre). A classificação econômica foi feita de acordo com o Critério de Classificação Econômica Brasil (CCEB) (15).

Avaliação do estado nutricional e idade gestacional

Para avaliação do estado nutricional, foi utilizado o peso aferido em cada trimestre gestacional no momento da consulta de pré-natal e no pós-parto empregando-se balança eletrônica digital (Plenna, modelo MEA 07700, São Paulo-SP, Brasil), com capacidade de 150kg e graduação de 100g. A altura foi aferida empregando-se a régua de balança antropométrica (Cauduro, modelo 101PL, Cachoeira do Sul-RS, Brasil).

O ganho de peso gestacional foi calculado pela diferença entre o peso obtido na última coleta de dados do estudo prospectivo (terceiro trimestre) e o peso pré-gestacional (relatado pela gestante).

Para o cálculo da idade gestacional foi empregada preferencialmente a data da última menstruação registrada em prontuário, posteriormente comparada aos dados da ultrassonografia realizada até a vigésima semana gestacional.

Estimativa do teor de ácidos graxos da dieta

A avaliação do consumo alimentar foi realizada através de três inquéritos recordatórios de 24 horas ao longo da gestação e dois IR24h no período pós-parto. Em uma subamostra de gestantes, um segundo IR24h foi obtido em cada trimestre gestacional para correção da variabilidade intraindividual. Os IR24h foram obtidos por nutricionistas treinados, empregando-se a técnica dos passos múltiplos (16).

Para a análise do teor de ácidos graxos dos recordatórios, foi utilizado o Programa NutWin® (NutWin Software, Programa de Apoio à Nutrição, Versão 1.5, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil, 2002), empregando a Tabela de Composição Química dos Alimentos-TACO (17) e, na ausência de dados sobre a composição de ácidos graxos de algum alimento, foi utilizada a tabela da USDA (18).

Determinação dos ácidos graxos do leite materno

Amostras (5-10 ml) de leite materno maduro posterior (a partir da 5ª semana pós-parto) foram obtidas por meio de visita domiciliar por ordenha manual pela própria mulher, pela manhã, imediatamente após a primeira mamada do bebê e antes do desjejum da mãe. O leite foi armazenado a -80°C até análise.

O teor de ácidos graxos do leite foi determinado no laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os ácidos graxos foram extraídos de acordo com o método proposto por Bligh e Dyer (19). Para essa análise, foram utilizados 800µl de leite aos quais se acrescentou metanol e clorofórmio (v/v, 1:1). Após a extração lipídica, a fase contendo clorofórmio foi evaporada em corrente de nitrogênio, e os ácidos graxos foram metilados com hidróxido de potássio em metanol (0,5M) e removidos com hexano. Foi injetado 1µl de ésteres metílicos de ácidos graxos no cromatógrafo gasoso SHIMADZU, GC-2014 (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany) equipado com autoinjetor AOC-20i (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany) e separado com coluna capilar de polietileno glicol – Supelcowax 10 (30m, 25mm X 0,25µm; Supelco Inc., Bellefonte, PA).

O gás de arraste utilizado foi o gás hélio a 1,0ml/min. O ar sintético foi utilizado para a ionização em chama com detecção a 280ºC. As injeções foram realizadas em modo *split*. As

temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C. A temperatura inicial da coluna foi de 100ºC mantida por 1 minuto, seguida de um aumento de 13ºC por minuto até 195ºC mantida por 5 minutos e posteriormente elevada a 240ºC, na taxa de 15ºC por minutos e mantida nessa temperatura por 30 minutos.

O padrão para identificação utilizado foi composto por um mix de ésteres metílicos de ácidos graxos da Supelco (Supelco 37 Component FAME Mix; Supelco Inc., Bellefonte, PA) com adição dos padrões de 9c,11t-CLA e 10t,12c-CLA. A quantificação foi feita por normalização de área, e os resultados estão apresentados em porcentagem por peso.

Análise dos dados

Modelos de regressão linear foram utilizados, empregando-se o teor de ácidos graxos do leite materno como variável dependente e ácido graxos da dieta materna em cada trimestre gestacional e no puerpério como variáveis independentes. Modelos lineares univariados e múltiplos ajustados pelo IMC pós-parto e deatenuados foram explorados.

Para a deatenuação, que consiste na correção do coeficiente de regressão linear pelo erro da variabilidade intra e interpessoal, foi utilizada a fórmula: $b_t = b_o$ [1 + (σ intra/ σ inter)/n^o IR24h] (20).

Onde b_t é o verdadeiro coeficiente de regressão, b_o é o coeficiente de regressão observado e as variâncias intra e interindividual foram obtidas através das análises de variância ANOVA.

As variáveis de confusão testadas nos modelos, empregando-se o teor de ácidos graxos no leite como variável dependente, foram: idade, renda familiar, anos de estudo, classe econômica, cor da pele, consumo de bebida alcóolica, tabagismo, prática de atividade física, IMC pré-gestacional, IMC pós-parto, semana gestacional no parto, ganho de peso gestacional, peso e comprimento ao nascer do bebê. Porém, apenas o IMC pós-parto estava diretamente relacionado com o teor de ácidos graxos do leite, sendo empregado como variável de ajuste no modelo final.

O número de dias, entre a obtenção dos IR24h na gestação e no período pós-parto, e a coleta do leite, também, foram testados no modelo de regressão linear, porém não houve associação.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SPSS (SPSS Software, Versão 17.0, SPSS Inc. Woking, Surrey, UK).

Resultados

No total, 75 mulheres completaram o estudo prospectivo, das quais 20 foram excluídas: 18 não estavam em aleitamento materno exclusivo ou predominante e duas desenvolveram diabetes gestacional. Dentre as mulheres elegíveis, duas se recusaram a participar do estudo, duas mulheres não foram localizadas, cinco mudaram de cidade e uma mulher não completou os IR24h no puerpério, totalizando-se 45 mulheres incluídas no presente estudo. As mulheres foram avaliadas no 1º trimestre (em média com 11 semanas gestacionais); 2º trimestre (em média com 23 semanas gestacionais); 3º trimestre (em média com 30 semanas gestacionais). A média de semanas em que as amostras de leite foram coletadas após o parto foi de 6,4 semanas (mínimo de 5 semanas e máximo de 12 semanas).

A Tabela 1 apresenta as características demográficas, socioeconômicas, de estado nutricional e aleitamento materno das participantes do estudo, sendo a maioria de cor de pele branca, casada, com a escolaridade correspondente a 8 ou mais anos de estudo, de classe econômica C, D e E.

A média e o desvio-padrão da estimativa de ácidos graxos da dieta, em cada trimestre gestacional e no período pós-parto, e da composição destes no leite materno maduro estão apresentados na Tabela 2.

Os coeficientes de regressão ß (IC 95%) da relação entre os ácidos graxos da dieta em cada trimestre gestacional e no período pós-parto com o teor de ácidos graxos do leite estão apresentados na Tabela 3. Após ajuste pelo IMC pós-parto e deatenuação dos coeficientes de regressão, verificou-se associação positiva entre o teor de EPA e DHA da dieta no terceiro trimestre gestacional e o teor destes ácidos graxos no leite maduro. Verificou-se que 25 e 33% do teor de EPA e DHA, respectivamente, do leite materno foi explicado pelo modelo testado. Observou-se associação positiva entre a razão n3/n6 na dieta do segundo e terceiro trimestres gestacionais, assim como no período pós-parto, com o teor no leite materno. Entretanto, os modelos explicaram apenas 22, 15 e 12% da razão n-3/n-6 no leite da dieta do segundo, terceiro trimestres gestacionais e no puerpério, respectivamente. Não houve associação entre a estimativa de outros ácidos graxos da dieta, ao longo da gestação e no período pós-parto, com a composição de ácidos graxos do leite materno.

Discussão

Este estudo foi inédito ao investigar a influência do teor de ácidos graxos da dieta, em distintos períodos da gestação, no teor de ácidos graxos no leite materno maduro.

Os dados demonstram que o teor de EPA e DHA da dieta, no terceiro trimestre gestacional, está diretamente relacionado com o teor destes ácidos graxos no leite materno maduro, entretanto não houve associação entre o teor de EPA e DHA da dieta no início da gestação, assim como no período pós-parto, com a composição do leite. Observou-se, também, associação direta entre a razão n3/n6 da dieta no segundo e terceiro trimestres gestacionais e no período pós-parto com a composição do leite.

Os resultados do presente estudo sugerem que os estoques corporais maternos de ácidos graxos possuem maior influência na composição do leite materno do que a dieta no puerpério. Além disso, apenas a dieta no terceiro trimestre gestacional esteve relacionada com o teor de EPA e DHA do leite materno. Uma possível explicação seria o maior ganho de peso e aumento dos estoques de gordura corporal, verificados no terceiro trimestre de gestação (21).

O teor de EPA e DHA da dieta do terceiro trimestre gestacional explicou 25% e 33%, respectivamente, da variabilidade destes ácidos graxos no leite materno, sugerindo que existem outros determinantes que contribuam para a variabilidade destes ácidos graxos. Estudos prévios sugerem que o grau de maturação do leite, idade gestacional no parto (22) e estado nutricional da lactante (13, 23) sejam preditores da composição dos ácidos graxos do leite materno. Para minimizar os possíveis vieses, a amostra do presente estudo foi composta por mulheres eutróficas no período pré-gestacional e que tiveram parto a termo, além disto, o leite materno maduro foi empregado. Dentre as variáveis de confusão investigadas, apenas o IMC pós-parto esteve associado à composição de ácidos graxos do leite, sendo portanto empregado como variável de ajuste nos modelos.

Um fator que também pode ter influenciado os resultados é a existência da competição entre o ácido linoleico (LA) e ALA pela enzima Δ^6 desaturase, responsável pela conversão destes em ARA e AGPI-CL n-3 (EPA e DHA) respectivamente (24), uma vez que a dieta da população brasileira é rica em LA (25), devido ao amplo consumo de óleos vegetais. A síntese endógena dos AGPI-CL n-3 pode ter sofrido uma interferência, levando a um menor teor de DHA e EPA do leite humano.

Em concordância com esses achados, Peng e colaboradores, 2009, verificaram que mulheres residentes na área costeira da China com dieta rica em AGPI-CL n-3 apresentaram maior teor de DHA no leite de transição, quando comparadas com as chinesas residentes no

interior do país. Entretanto o teor de EPA foi semelhante no leite materno das mulheres, nas distintas regiões (12).

Ensaios clínicos randomizados verificaram um aumento do teor de DHA no leite materno após a suplementação de DHA ou óleo de peixe durante a gestação, assim como no pós-parto (5-8). Entretanto, o efeito do uso de suplementos no teor de EPA e ALA é controverso (5, 6). Tal inconsistência nos achados poderia ser atribuída ao tipo de suplemento administrado (cápsulas de DHA derivado de algas ou de óleo de peixes) e/ou a quantidade suplementada (2g ou 400mg).

No presente estudo, não houve associação entre o teor de ácidos graxos n-6 (LA e ARA) da dieta materna e a composição de ácidos graxos do leite. Entretanto, verifica-se uma relação direta entre a razão n3/n-6 da dieta no segundo e terceiro trimestres gestacionais, assim como no período pós-parto com a composição do leite. Os óleos vegetais são as principais fontes de n-6 da dieta, cuja estimativa acurada é de difícil obtenção devido à dificuldade no relato da quantidade deste alimento adicionado ao preparo dos alimentos e tempero das saladas, resultando em maior erro de medida, o que poderia ter atenuado as associações.

Estudos prévios feitos com isótopos marcados verificaram uma pequena contribuição da dieta materna durante o puerpério (30% do LA e 10% do ARA) no leite materno (26), sugerindo que estes ácidos graxos da dieta não chegam de forma direta às glândulas mamárias após a absorção intestinal, mas que são temporariamente estocados no organismo e posteriormente liberados na circulação, sendo os estoques maternos a principal fonte dos n-6, em especial do ARA (26).

Ensaios clínicos aleatorizados controlados demonstraram que a suplementação de ARA a longo prazo (≥ 8 semanas) no pós-parto ou desde o segundo trimestre gestacional até a 12ª semana pós-parto, associada ou não à suplementação de DHA e EPA, levou a um aumento de ARA no leite materno (9, 10). Entretanto, a suplementação de ARA a curto prazo (1 semana) no período pós-parto não teve efeito no teor de ARA do leite materno (11). Sugerindo que o ARA da dieta somente influencia o leite materno após uma suplementação/oferta prolongada deste ácido graxo, uma vez que estes passam a constituir os estoques corporais.

Não houve associação entre o teor de *trans* da dieta materna e a composição do leite, contrastando com os dados de estudos prévios (27, 28). Uma possível explicação é que, para a estimativa do teor de *trans* dos alimentos, empregaram-se valores médios determinados por tabelas de composição química de alimentos inespecíficos para este ácido graxo. Sabe-se que

o teor de *trans* nos alimentos pode variar segundo a marca, o que não foi especificado na obtenção de dados do consumo alimentar materno. Além disso, no Brasil existe uma fragilidade na declaração do teor de *trans* no rótulo dos alimentos (29), o que dificulta a estimativa do consumo real deste ácido graxo, podendo dessa forma ter interferido nos resultados.

Dentre as limitações do estudo, destaca-se o número reduzido de IR24h obtido em cada período, o que poderá ter atenuado as associações. Além disso, um pequeno tamanho amostral foi empregado. Os modelos empregados explicaram pequena proporção da variabilidade da composição de ácidos graxos do leite, sugerindo a existência de outros fatores preditores que não foram considerados nos modelos de regressão linear.

O presente estudo demonstrou que o DHA e o EPA da dieta materna, durante o terceiro trimestre, e a razão n3/n6 da dieta do segundo e terceiro trimestres gestacionais e no período pós-parto estão associados ao teor destes no leite materno maduro. Não houve associação de outros ácidos graxos da dieta materna com o leite. Dada a importância dos AGPI-CL n-3 no adequado desenvolvimento infantil, os resultados são relevantes para o planejamento de intervenções que visem à melhoria da disponibilidade destes ácidos graxos no leite materno, sendo que o consumo de alimentos fontes de n-3 deva ser incentivado, principalmente durante o terceiro trimestre gestacional.

Referências Bibliográficas

1. Innis SM. Fatty acids and early human development. Early Hum Dev. 2007;83(12):761-6.
2. Torres AG, Trugo NM. Evidence of inadequate docosahexaenoic acid status in Brazilian pregnant and lactating women. Rev Saude Publica. 2009;43(2):359-68.
3. Schmeits BL, Cook JA, VanderJagt DJ, Magnussen MA, Bhatt SK, Bobik Jr EG, et al. Fatty acid composition of the milk lipids of women in Nepal. Nutrition Research. 1999;19(9):1339-48.
4. Koletzko B, Rodriguez-Palmero M, Demmelmair H, Fidler N, Jensen R, Sauerwald T. Physiological aspects of human milk lipids. Early Hum Dev. 2001;65:3-18.
5. Dunstan JA, Mitoulas LR, Dixon G, Doherty DA, Hartmann PE, Simmer K, et al. The effects of fish oil supplementation in pregnancy on breast milk fatty acid composition over the course of lactation: a randomized controlled trial. Pediatr Res. 2007;62(6):689-94.
6. Imhoff-Kunsch B, Stein AD, Villalpando S, Martorell R, Ramakrishnan U. Docosahexaenoic acid supplementation from mid-pregnancy to parturition influenced breast milk fatty acid concentrations at 1 month postpartum in Mexican women. J Nutr. 2011;141(2):321-6.
7. Jensen CL, Maude M, Anderson RE, Heird WC. Effect of docosahexaenoic acid supplementation of lactating women on the fatty acid composition of breast milk lipids and maternal and infant plasma phospholipids. Am J Clin Nutr. 2000;71(1):292-9.
8. Makrides M, Neumann MA, Gibson RA. Effect of maternal docosahexaenoic acid (DHA) supplementation on breast milk composition. Eur J Clin Nutr. 1996;50(6):352-7.
9. van Goor SA, Dijck-Brouwer DA, Hadders-Algra M, Doornbos B, Erwich JJ, Schaafsma A, et al. Human milk arachidonic acid and docosahexaenoic acid contents increase following supplementation during pregnancy and lactation. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2009 ;80(1):65-9.
10. Weseler AR, Dirix CE, Bruins MJ, Hornstra G. Dietary arachidonic acid dose-dependently increases the arachidonic acid concentration in human milk. J Nutr. 2008;138(11):2190-7.
11. Smit EN, Koopmann M, Boersma ER, Muskiet FA. Effect of supplementation of arachidonic acid (AA) or a combination of AA plus docosahexaenoic acid on breastmilk fatty acid composition. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2000;62(6):335-40.
12. Peng Y, Zhou T, Wang Q, Liu P, Zhang T, Zetterström R, et al. Fatty acid composition of diet, cord blood and breast milk in Chinese mothers with different dietary habits. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2009;81(5-6):325-30.
13. Mäkelä J, Linderborg K, Niinikoski H, Yang B, Lagström H. Breast milk fatty acid composition differs between overweight and normal weight women: the STEPS Study. Eur J Nutr. 2012 May 26 [Epub Ahed of print]. Disponível em: http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00394-012-0378-5
14. Haggarty P. Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy. Eur J Clin Nutr. 2004;58(12):1559-70.
15. Associação Brasileira de Pesquisas (ABEP). Dados com base no levantamento socioeconômico 2006 e 2007. Disponível em <http://www.abep.org>. Acesso em 28 jan 2008.
16. Johnson RK, Soultanakis RP, Matthews DE. Literacy and body fatness are associated with underreporting of energy intake in US low-income women using the multiple-pass 24-hour recall: a doubly labeled water study. J Am Diet Assoc. 1998;98(10):1136-40.

17. Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação (2006). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, Versão 2, 2nd ed. Campinas: Universidade Estadual de Campinas.
18. United States Department of Agriculture. Nutrient Database for Standard Reference. Beltsville, MD: Agricultural Research Service, USDA; 2001. Disponível em http://www.usda.gov
19. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 1959;37(8):911-7.
20. Beaton GH, Milner J, Corey P, McGuire V, Cousins M, Stewart E, et al. Sources of variance in 24-hour dietary recall data: implications for nutrition study design and interpretation. Am J Clin Nutr. 1979;32(12):2546-59.
21. Haggarty P. Fatty acid supply to the human fetus. Annu Rev Nutr. 2010;30:237-55.
22. Genzel-Boroviczény O, Wahle J, Koletzko B. Fatty acid composition of human milk during the 1st month after term and preterm delivery. Eur J Pediatr. 1997;156(2):142-7.
23. Marín MC, Sanjurjo A, Rodrigo MA, de Alaniz MJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids in breast milk in La Plata, Argentina: relationship with maternal nutritional status. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2005;73(5):355-60.
24. Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. Am J Clin Nutr. 2006;83(6):1467-76.
25. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Brasil). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE; 2011.
26. Del Prado M, Villalpando S, Elizondo A, Rodríguez M, Demmelmair H, Koletzko B. Contibution of dietary and newly formed arachidonic acid to human milk lipids in women eating a low-fat diet. Am J Clin Nutr. 2001;74(2):242-7.
27. Mojska H, Socha P, Socha J, Soplińska E, Jaroszewska-Balicka W, Szponar L. Trans fatty acids in human milk in Poland and their association with breastfeeding mothers' diets. Acta Paediatr. 2003;92(12):1381-7.
28. Samur G, Topcu A, Turan S. Trans fatty acids and fatty acid composition of mature breast milk in turkish women and their association with maternal diet's. Lipids. 2009;44(5):405-13.
29. Silveira BM, Proença RP. [Intake recommendations and labeling of trans fat in processed foods in Brazil: analysis of official documents]. Rev Saude Publica. 2012;46(5):923-8.

Tabela 1. Características maternas e tipo de aleitamento em mulheres residentes em Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2010 (n=45).

Características	**Média**	**Desvio-padrão**
Idade	25	4,48
IMC (pré-gestacional)	21,94	1,79
IMC (pós-parto)	23,98	2,42
Cor da pele	**Número**	**%**
Branca	23	51,11
Parda/mulata	16	35,55
Outras	6	13,33
Escolaridade (anos de estudo)		
Até 4 anos	2	4,44
De 4 a 8 anos	11	24,44
Mais de 8 anos	32	71,11
Classe econômica		
A e B	5	11,11
C, D e E	32	88,88
Em aleitamento exclusivo	23	51,11
Em aleitamento predominante	22	48,88