AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**AVALIAÇÃO DOS TEORES DE ELEMENTOS ESSENCIAIS NO LEITE
MATERNO DE MÃES DE RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS E A TERMO E
EM FÓRMULAS INFANTIS POR MEIO DA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM
NÊUTRONS**

PAOLA DE SOUZA SANTOS

**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do Grau de Mestre em Ciências na
área de Tecnologia Nuclear -
Aplicações**

**Orientadora:
Dra. Vera Akiko Maihara**

**SÃO PAULO
2009**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO DOS TEORES DE ELEMENTOS ESSENCIAIS NO LEITE
MATERNO DE MÃES DE RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS E A TERMO E
EM FÓRMULAS INFANTIS POR MEIO DA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM
NÊUTRONS**

PAOLA DE SOUZA SANTOS

**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do Grau de Mestre em Ciências na
área de Tecnologia Nuclear -
Aplicações**

**Orientadora:
Dra. Vera Akiko Maihara**

**SÃO PAULO
2009**

***Aos meus pais, irmão e ao
Rodrigo com todo carinho***

AGRADECIMENTOS

À Dra. Vera Akiko Maihara meus sinceros agradecimentos pela orientação e pela paciência, confiança e a amizade formada ao longo da pesquisa científica, pois sem a qual esse trabalho não teria sido possível.

Ao Dr. Rubens César Lopes Figueira dedico esse trabalho pelo apoio no início da minha jornada na pesquisa científica, que por horas dedicou o seu restrito tempo em ensinar-me trilhar caminhos estreitos e trabalhosos.

À Dra. Mitiko Saiki, pelo auxílio e apoio que contribuíram para a realização deste trabalho e muitíssimo obrigada pelo carinho e os ensinamentos transmitidos ao longo da pesquisa.

À Dra. Maria Esther Ceccon (Chichina), à Dra. Jane Oba e ao Dr. Arthur Delgado da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo meus mais sinceros agradecimentos pela parceria formada e pelo carinho com a pesquisa desenvolvida no IPEN. Ao Prof. Dr. Ulysses Doria pela colaboração nas análises estatísticas.

À equipe fantástica e atenciosa do Hospital Estadual Sapopemba – SP que coordenada pela Dra. Cecília N. Lin Yu cedeu o espaço para a coleta das amostras de leite materno.

Às mães doadoras das amostras de leite materno em especial aquelas que com muito sacrifício doaram o fluído objeto de estudo desse trabalho, pois sem o consentimento delas esse trabalho não seria viável.

Às Dras. Marina, Déborah, Ana, Maria José (Tata), Rosemeire, Luciana, Andreza e ao Edson Moreira do Laboratório de Ativação Neutrônica (LAN) do IPEN, obrigada pela amizade e o apoio durante a realização desse trabalho.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 06/58518-1).

Ao IPEN/CNEN-SP, pela oportunidade de realizar este trabalho, no LAN.

Aos amigos, Edson Alves, Regina, Michel, Guilherme, Edmila, Nathália, Larissa, Fábio Luz, Cristina, Rosimeiri, Kelly, Guilherme Zahn, Cláudio, Fábio Toledo, Irene pela amizade e convívio.

Agradeço em especial amigadas que se formaram no início do mestrado e que hoje são impossíveis de viver sem elas, amo sem moderação Lilian (Piri), Patrícia (Paty) e Selma (Selmita).

À Dra. Sonia Buongiorno de Souza pelos ensinamentos na disciplina Nutrição na Infância e pelas preciosas sugestões no fechamento desse trabalho.

Aos meus pais Luzia e Léo, meu irmão Ricardo e ao meu namorado Rodrigo agradeço pelo apoio e carinho com o qual eu sempre pude contar. Obrigada!

Finalmente agradeço a Deus e a todos que contribuíram de diversas formas para realização desse trabalho. Muito obrigada!

***“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”***

Albert Einstein

AVALIAÇÃO DOS TEORES DE ELEMENTOS ESSENCIAIS NO LEITE MATERNO DE MÃES DE RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS E A TERMO E EM FÓRMULAS INFANTIS POR MEIO DA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS

Paola de Souza Santos

RESUMO

Muitos estudos têm enfatizado a necessidade de elementos traço durante a infância e sua biodisponibilidade no leite materno. A ausência de elementos essenciais pode levar a várias deficiências. Os elementos essenciais têm importância para os recém-nascidos devido à necessidade indispensáveis desses elementos em relação a crescimento acelerado nesse período. Neste sentido, o objetivo deste estudo consistiu em contribuir para o conhecimento dos teores dos elementos essenciais Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn no leite materno (colostro) de mães de neonatos pré-termo e a termo. As amostras de colostro foram coletadas de forma manual do primeiro ao quinto dia após o parto. Após a coleta, as amostras foram congeladas e liofilizadas. Foram também analisadas as principais fórmulas infantis comercializadas na Cidade de São Paulo. As concentrações dos elementos essenciais foram determinadas em 30 amostras de leite colostro e 17 amostras de fórmula infantil por meio da Análise por Ativação com Nêutrons (NAA). Análises multivariadas foram aplicadas e as amostras foram separadas em dois grupos. No entanto, a separação não foi relacionada com a idade gestacional. Os resultados deste estudo mostraram que os níveis de concentração dos elementos Ca, K e Na nas amostras de fórmula infantil analisadas estavam em acordo com as informações impressas nos rótulos e também dentro dos valores recomendados pela ANVISA e do Codex

Allimentarius e, portanto, adequado para recomendações nutricionais dos lactentes.

EVALUATION OF ESSENCIAL TRACE ELEMENTS IN PRETERM AND FULL-TERM MILK AND INFANTIL FORMULAS BY NEUTRON ACTIVATION ANALYSIS

Paola de Souza Santos

ABSTRACT

Many studies have emphasized the need of trace elements during infancy and their adequate availability in human milk. Deficiency of minor and trace elements can lead to various disorders in infants. During early childhood trace element requirements, are more critical due to faster growth rates. In this study, Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se and Zn were determined in human colostrum samples from mothers of preterm and full-term newborns. Samples were collected by manual expression from the first to the fifth day after birth. After collection, human colostrum samples were frozen and freeze-dried for analyses. Few of the most commonly commercialized were also analyzed. The essential element concentrations were determined in 30 colostrum samples and 17 milk formula brands by Instrumental Neutron Activation Analysis. Multivariate analyses were applied and the results were separated in two clusters. However the separation was not related to the corresponding gestational age. Results of this study showed that the concentration levels of the essential element Ca, K and Na in the milk formula samples analyzed were in agreement with the printed information on the labels. All concentration levels were also within ANVISA and *Codex Alimentarius* recommended values and thus adequate for infant nutritional needs.

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Leite Materno	1
1.1.1 Importância do leite materno	1
1.1.2 Anatomia da mama	3
1.1.3 Fisiologia da mama	4
1.1.4 Composição do leite materno	5
1.1.5 Classificação dos recém-nascidos	7
1.2 Fórmula infantil	7
1.2.1 Características gerais das fórmulas infantis	7
1.2.2 Comparação entre leite materno e fórmula infantil	8
1.2.3 Classificação e definição das fórmulas infantis	10
CAPÍTULO 2	13
2. OBJETIVOS	13
CAPÍTULO 3	14
3. IMPORTÂNCIA DOS ELEMENTOS ESSENCIAIS PARA O PRESENTE ESTUDO	14
3.1 Cálcio	15
3.2 Cloro	16
3.3 Ferro	17
3.4 Magnésio	19
3.5 Manganês	20
3.6 Potássio	20
3.7 Selênio	21
3.8 Sódio	22
3.9 Zinco	23

CAPÍTULO 4	25
4. REVISAO DA LITERATURA	25
4.1 leite materno e fórmula infantil	25
CAPÍTULO 5	36
5. METODOLOGIA	36
5.1 Princípios do método de Análise por Ativação com Nêutrons	36
CAPÍTULO 6	46
6. PARTE EXPERIMENTAL	46
6.1 Leite materno	46
6.1.1 Parceria com o Instituto da Criança do HCFUSP	46
6.1.2 Características gerais do local da coleta de leite materno – Hospital Estadual Sapopemba (HES)	46
6.1.3 Aspectos éticos	48
6.1.4 Características da população estudada	49
6.1.5 Termo de Consentimento e entrevistas com as mães doadoras	49
6.1.6 Coleta das amostras	50
6.1.7 Transporte das amostras	51
6.1.8 Tratamento das amostras de leite materno	51
6.2 Fórmulas infantis	53
6.2.1 Aquisição das fórmulas infantis	53
6.2.2 Preparação das amostras	53
6.2.3 Teor de umidade residual	54
6.3 Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental – INAA	57
6.3.1 Preparação dos padrões sintéticos	57
6.3.2 Preparação e irradiação para determinação de radionuclídeos de meia-vida curtas (<15 horas)	59
6.3.2.1 Leite materno	59

6.3.3 Preparação e irradiação para determinação de radionuclídeos de meia-vida longa (de dias a anos)	59
6.3.3.1 Leite materno	59
6.3.3.2 Fórmula infantil	60
6.3.4 Período de decaimento	61
6.3.5 Medidas das atividades induzidas	61
6.3.5.1 Medidas das atividades induzidas após “irradiação curta”	61
6.3.5.2 Medidas das atividades induzidas após “irradiação longa”	61
6.3.6 Espectrômetro utilizado	62
6.3.7 Identificação dos radionuclídeos	63
 CAPÍTULO 7	 64
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
7.1 Avaliação da precisão e exatidão da metodologia de INAA	64
7.2 Determinação dos limites de detecção e quantificação	66
7.3 Análise das amostras de leite materno por INAA	67
7.3.1 Análise estatística – Leite materno	75
7.4 Análise das fórmulas infantis comercializadas por INAA	88
 CAPÍTULO 8	 93
8. CONCLUSÃO	93
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 95
ANEXOS	104

CAPÍTULO 1

1. Introdução

1.1 Leite materno

1.1.1 Importância do leite materno

O corpo humano necessita de uma série de substâncias para a manutenção equilibrada de todas as suas funções vitais. O metabolismo, as funções vitais e as necessidades nutricionais de um número cada vez maior de elementos inorgânicos têm sido objetos de estudos de inúmeros pesquisadores (COZZOLINO, 2007).

O estudo da composição de nutrientes em leite materno tem fundamental importância, uma vez que o leite materno é a primeira e única fonte de todos os nutrientes necessários para as funções biológicas e para o crescimento acelerado que ocorre nas crianças recém-nascidas.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda amamentação exclusivamente com leite materno até os seis meses de idade e a complementação do leite materno, a partir dos seis meses até os 2 anos de idade. O leite materno é fundamental para atender às necessidades nutricionais do lactente (WHO, 2001).

A importância de manter o aleitamento materno é comprovada por estudos clínicos que demonstram que os lactentes amamentados têm menor

incidência de infecções respiratórias e do trato digestivo, sendo o efeito protetor do leite humano mediado por anticorpos maternos contra patógenos ambientais, bem como por outras substâncias como a lactoferrina e a lisozima (SCARIATI, 1997; WOLD & ADLERBERTH, 1998).

É importante ressaltar que nenhum outro alimento oferece as características imunológicas do leite materno. Estudo conduzido por Victora et al (1987) constatou que crianças que não recebiam leite materno tinham maiores riscos de morrer por diarreia (risco 14,2 vezes maior), de mortalidade por doenças respiratórias (3,6 vezes maior) e por outros tipos de infecções (2,5 vezes maior), quando comparadas às que recebiam apenas leite materno sem complementos.

Outro estudo mostrou o efeito do uso de leite artificial nas taxas de internação por pneumonia. Em crianças não amamentadas, a chance de hospitalização nos primeiros 3 meses foi de 61 vezes maior do que em crianças amamentadas exclusivamente. Esse risco foi de 2,9 vezes maior em crianças amamentadas em regime não exclusivo (CESAR et al, 1999).

A suplementação do leite materno com água ou chás nos primeiros 6 meses é desnecessária, mesmo em locais secos e quentes (SACHDEV et al, 1991; ASHRAF et al, 1993). Mesmo ingerindo pouco colostro nos primeiros dias de vida, recém-nascidos normais não necessitam de mais líquidos além do leite materno, pois nascem com níveis de hidratação tecidual relativamente alto (AKRE, 1989).

Além de maior proteção contra infecções, a amamentação exclusiva é importante do ponto de vista nutricional. A suplementação com outros alimentos líquidos diminui a ingestão de leite materno, além de interferir com a

biodisponibilidade de nutrientes chaves do leite materno, como o ferro e o zinco, e reduzir a duração do aleitamento materno (OSKI & LANDAW, 1980).

1.1.2 Anatomia da mama

A mama é formada por unidades glandulares independentes denominadas lobos, cada um dos quais está subdividido em lóbulos constituídos por alvéolos, unidades formadoras do leite. Cada lobo é drenado por um canal galactóforo que comunica com o exterior através de um orifício de abertura no mamilo (WHEATER et al, 1987). Antes desta abertura cada canal apresenta uma dilatação – seio galactóforo, que se situa sob a aréola (NEVILLE, 2001; BEDINGHAUS & MELNIKOW, 1992). As estruturas que constituem a anatomia da mama estão apresentadas na Figura 1.1.

FIGURA 1.1 – Anatomia da mama

1.1.3 Fisiologia da mama

Ao longo da gravidez a mama, sob influência hormonal, diferencia-se de modo a ficar apta a produzir leite (NEVILLE, 2001). A produção e a ejeção do leite dependem de reflexo neuroendócrino (SPENCER & JONES, 2002). Durante a sucção os estímulos de mecanorreceptores do mamilo e da aréola enviam impulsos nervosos, que por meio do hipotálamo, levam à liberação de dois hormônios na hipófise: a prolactina (hipófise anterior) e a ocitocina (hipófise posterior) (LAWRENCE, 1989).

Por ação da prolactina, o leite materno é continuamente produzido ficando armazenado no lúmen alveolar (NEVILLE, 2001). O único estímulo eficaz para a liberação da prolactina é a sucção ou extração do leite com ação mecânica, que pode ser esquematizado conforme mostrado na Figura 1.2 (LAWRENCE, 1995).

Existem fatores locais que inibem a produção de leite sempre que este se acumula na mama (NEIFERT, 1998). A ocitocina estimula a contração das células mioepiteliais que envolvem os alvéolos e canais galactóforos. Quando estas se contraem, o leite é conduzido dos alvéolos aos canais e seios galactóforos – reflexo de ejeção do leite ou “let-down reflex” (LAWRENCE, 1995; NEVILLE, 2001). Só então o leite poderá ser retirado pelo bebê (SPENCER & JONES, 2002). Inicialmente este reflexo é não condicionado, mas, rapidamente, deixa de ser. Quando a lactação já está bem implementada, estímulos como cheirar, ver ou ouvir o bebê, entre outros, podem ser suficientes para libertar o leite armazenado (BEDINGHAUS & MELNIKOW, 1992; LAWRENCE, 1995).

Tendo presente estas noções é fácil compreender que, a introdução de qualquer suplemento na alimentação do bebê, reduz os estímulos e favorece o

não esvaziamento da mama, inibindo assim a produção de leite (MARTINEZ et al, 1992).

FIGURA 1.2 – Mecanismo fisiológico da secreção do leite materno

1.1.4 Composição do leite materno

O leite materno é uma complexa mistura de substâncias produzidas pelo corpo materno (substâncias endógenas) e por substâncias introduzidas pelo meio externo (substâncias exógenas). Contém centenas de substâncias endógenas, muitas fundamentais para o desenvolvimento do bebê.

Os principais constituintes do leite materno são as proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas, anticorpos, água e elementos traço. A água está

em maior porcentagem (88% da composição do leite), na qual os íons (sódio, potássio, cloro, cálcio e fosfato) difundem-se livremente pela membrana da célula. Os lipídios (principalmente triglicerídeos) constituem cerca de 3 a 4% da composição do leite humano. O leite humano é composto de aproximadamente 1,5% de proteínas (principalmente lactoalbumina e caseína). Os carboidratos, principalmente a lactose, constituem cerca de 7% do leite humano e encontram-se dentro de vacúolos, juntamente com as proteínas. As vitaminas e anticorpos (imunoglobulinas) são transportados através da célula em pequenas vesículas de membrana, provavelmente a partir da corrente sanguínea (JÚNIOR & ROMUALDO, 2002).

As substâncias exógenas podem ser introduzidas tanto pela ingestão de alimentos, bebidas, remédios e drogas lícitas e não lícitas como por inalação de substâncias voláteis e por contato na pele (LAKIND et al, 2004).

Após o parto, o leite materno sofre importantes alterações na sua composição nutricional. Nos primeiros cinco dias, o leite é denominado colostro, do 6º ao 10º dia é denominado leite de transição e a partir do 10º dia leite maduro. O colostro apresenta maior concentração de elementos traço e proteínas com funções protetoras como imunoglobulinas e lactoferrina e menor de hidrato de carbono e lipídeos. No leite de transição ocorre progressivamente diminuição da concentração de elementos traço e proteínas e aumento do teor de hidratos de carbono e lipídeos (ARNAUD & FAVIER, 1995; NEVILLE et al, 2001). O leite maduro sofre poucas variações no seu teor de nutrientes (FULHAN et al, 2003), para o conteúdo lipídico há um aumento ao longo da mamada, varia com a dieta materna, com o volume de leite produzido, com a fase de lactação, entre outros fatores (PICCIANO, 2001).

De um modo geral, podemos considerar que com a progressão da lactação ocorre significativa diminuição no teor de elementos traço e minerais e poucas variações na composição de macronutrientes (LAKIND et al, 2004).

As variações na composição ocorrem devido a muitos fatores, como o estado nutricional da mãe, a idade materna, o peso do bebê, a fase da lactação, entre outros fatores (ARNAULD & FAVIER, 1995; LEOTSINIDIS et al, 2005).

1.1.5 Classificação dos recém-nascidos

Os recém-nascidos são classificados de acordo com a idade gestacional. Os recém-nascidos que nascem antes das 37 semanas de gestação ou menos do que 259 dias são classificados como pré-termo (premature). Para a idade gestacional normal, que compreende 37 semanas completas e menos do que 42 semanas ou de 259 a 293 dias, os recém-nascidos são classificados como termo, a partir da 42ª semana ou 293 dias de gestação o recém-nascido é classificado como pós-termo (WHO, 2001; 2006).

1.2 Fórmula infantil

1.2.1 Características gerais das fórmulas infantis

Estudos científicos têm demonstrado cada vez mais a importância do aleitamento materno para a saúde materno-infantil. Entretanto, quando não há possibilidade das mães manterem a amamentação, é recomendado o uso de substitutos de leite adaptados para o lactente (KAZAL, 2002).

De acordo com o *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 1982), as melhores opções de substituto do leite materno são as fórmulas infantis, e quando preparadas sob condições apropriadas de higiene podem ser utilizadas para

alimentar as crianças, na impossibilidade do aleitamento materno. Numerosos produtos infantis têm sido produzidos e formulados para satisfazer as necessidades nutricionais para os recém-nascidos saudáveis, com doenças gastrointestinais e com baixo peso. Devido à variação dos nutrientes nos alimentos, como a soja e o leite de vaca fontes de preparação das fórmulas infantis, estabeleceu-se que devem apresentar níveis similares de nutrientes aos apresentados pelo leite materno (FAO/WHO, 1982; KASHLAN et al, 1991).

1.2.2 Comparação entre leite materno e fórmula infantil

As fórmulas mais comumente comercializadas têm como matéria prima básica o leite de vaca. Como o leite de vaca não é apropriado para o recém-nascido humano, ele necessita passar por processos de manufatura para se tornar mais digerível e absorvível (MOURA, 2002). A seguir serão apresentadas as comparações e as mudanças que ocorrem durante a manufatura das fórmulas infantis a partir do leite de vaca.

Inicialmente, o leite de vaca integral é desidratado de modo a ter maior durabilidade, maior tempo de prateleira, pois há redução da atividade de água e, conseqüentemente, da sua disponibilidade para participar das transformações químicas, bioquímicas e microbiológicas (JENSEN, 2002).

A osmolaridade do leite de vaca é cerca de 22% maior do que a osmolaridade do leite humano, devido ao maior teor de proteínas e minerais, o que aumenta a carga renal de solutos em 280% (FOMON, 1987). Esta característica obriga à maior diluição do leite de vaca. A maioria das fórmulas inclui lactose, sacarose, xarope de milho (frutose) e/ou maltose-dextrina e outras acrescentam amido de diferentes fontes (MOURA, 2002).

Quanto às proteínas, além da correção necessária pela diluição para reduzir a osmolaridade, há também o acréscimo de proteínas do soro do leite ou do próprio soro do leite desmineralizado. Esta adição tem a finalidade de melhorar a razão entre a proteína do soro e a caseína. Isto significa que o leite de vaca contém o dobro de caseína do leite humano (MAHAN et al., 1992).

Devido à adição de óleos vegetais, objetivando o aumento de ácidos graxos essenciais, ao leite desnatado, as fórmulas apresentam alta razão ácidos graxos poliinsaturados / ácidos graxos saturados e pouco ou nenhum colesterol. Então os ácidos graxos saturados do leite de vaca foram em grande parte removidos e substituídos por ácidos graxos mono e poliinsaturados (ESCOBAR et al, 2002).

Mais recentemente, o aminoácido taurina, presente no leite humano e ausente no leite de vaca, tem sido adicionado à algumas fórmulas, por sua importância na formação do cérebro e da retina.

Fórmulas para necessidades dietoterápicas específicas são desenvolvidas com lactoalbumina hidrolisada e adição de aminoácidos. Outras, contra alergia à proteína de origem animal, têm como base a proteína da soja, que também é altamente alergênica (MOURA, 2002).

As concentrações minerais presentes no leite de vaca foram reduzidas, atingindo níveis semelhantes aos do leite materno. Foram também acrescentadas múltiplas vitaminas para satisfazer as necessidades dos recém-nascidos (ESCOBAR et al., 2002). Dos minerais em excesso no leite de vaca, o sódio apresenta-se em quantidade três vezes superior à do leite humano. Além da correção pela diluição, a exemplo das proteínas, também ocorre desmineralização parcial (LÖNNERDAL, 2000).

Embora a quantidade de ferro do leite de vaca seja semelhante ao teor de ferro presente no leite humano, o leite de vaca não possui o ferro na forma heme que é melhor absorvido pelo organismo (COSTA & MONTEIRO, 2004). Segundo estudos experimentais, o leite de vaca ainda tem o potencial de inibir a absorção de ferro heme e não heme presente nos demais alimentos ingeridos pela criança. Desta forma a absorção do ferro é muito diferente; para tentar compensar esta diferença, ferro é acrescido às fórmulas (MOURA, 2002).

O zinco também apresenta absorção diferenciada, e sua biodisponibilidade no leite humano é alta, chegando a absorção de 41% contra 28% no leite de vaca, 31% nas fórmulas e 14% nas fórmulas à base de soja (JOHNSON & EVANS, 1978).

Conforme descrito anteriormente, não há nenhuma vantagem na utilização de fórmulas infantis. A opção da substituição do leite materno deve ser consciente e ser o último recurso para a alimentação infantil. Nos dias atuais, as indústrias têm tecnologia avançada disponível para a manufatura das fórmulas infantis, mas é impossível reproduzir o leite humano.

1.2.3 Classificação e definição das fórmulas infantis

Segundo a Norma Brasileira de Comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância, bicos, chupetas e mamadeiras (NBCAL, 2002), as fórmulas infantis são definidas como:

a) fórmula de nutrientes para recém-nascidos de alto risco – composto de nutrientes apresentados e/ou indicados para suplementar a alimentação de recém-nascidos prematuros ou de alto risco.

b) fórmula infantil para lactente – é o produto em forma líquida ou em pó, destinado a alimentação de lactentes, até o sexto mês, sob prescrição, em substituição total ou parcial do leite materno, para satisfação das necessidades nutricionais deste grupo etário. Neste tipo de fórmula há modificações em relação aos macro e micronutrientes para se aproximar da composição do leite materno.

c) fórmula infantil para necessidades dietoterápicas específicas – é aquela cuja composição foi alterada com o objetivo de atender às necessidades específicas decorrentes de alterações fisiológicas e/ou patológicas temporárias ou permanentes, por exemplo, as fórmulas à base de soja são recomendadas para bebês que apresentam intolerância à lactose e galactose. Essas fórmulas diferem das fórmulas à base de leite de vaca, quanto à proteína e ao tipo de carboidrato em sua composição. Elas contêm sacarose, mais facilmente digeridas e absorvidas pelo bebê (SCHWARTZMAN, 2000).

Entretanto, as fórmulas específicas são indicadas também quando os bebês não toleram fórmulas à base de proteína do leite de vaca ou à base de soja. Frequentemente, esses neonatos apresentam diagnóstico de alergia alimentar, intolerância à lactose ou síndrome de má-absorção.

d) fórmula infantil de seguimento para lactentes – é o produto em forma líquida ou em pó utilizado, quando indicado, como substituto do leite materno a partir do sexto mês.

e) fórmula infantil de seguimento para crianças de primeira infância – é o produto em forma líquida ou em pó utilizado como substituto do leite materno para crianças de primeira infância (de 12 meses a 3 anos de idade).

Nos últimos anos, há um crescente interesse em estudar as fórmulas infantis com o objetivo de verificar as concentrações dos elementos declarados nos rótulos.

CAPÍTULO 2

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho consistem em:

1- determinar os teores de Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn em amostras de leite materno (coloostro) pelo Método de Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA);

2 - comparar os teores dos elementos do leite materno pré-termo com o leite termo;

3 - determinar as concentrações de Ca, Fe, K, Na, Se e Zn nas fórmulas infantis por INAA;

4 - comparar os teores dos elementos presentes nas fórmulas infantis com a rotulagem do fabricante, com as recomendações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e com a *Codex Alimentarius*.

CAPÍTULO 3

3. Importância dos elementos essenciais para o presente estudo

Os elementos essenciais presentes no leite são classificados em macroelementos (cálcio (Ca), cloro (Cl), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K) e sódio (Na)), aqueles em maior quantidade, e os microelementos ou elementos traço (cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), flúor (F), manganês (Mn), selênio (Se), zinco (Zn), etc.), encontrados em baixa concentração nos organismos e são essenciais aos processos biológicos.

No leite materno os minerais mostram-se adequados, em quantidade e proporção, ao recém-nascido a termo, evitando a sobrecarga renal de solutos. A concentração de sódio corresponde à terça parte da concentração encontrada no leite de vaca. Ele também possui potássio, cálcio e fósforo que atendem ao crescimento do recém-nascido. Embora o leite de vaca tenha mais ferro em relação ao leite humano, as crianças amamentadas ao seio raramente desenvolvem anemia ferropriva, pois a biodisponibilidade do ferro no leite materno é maior. Para o recém-nascido pré-termo, o leite humano não oferece aporte suficiente de cálcio, fósforo, zinco, cobre e ferro, devido o recém-nascido pré-termo necessitar desses elementos em maior proporção para crescer e desenvolver em uma velocidade mais acelerada. Entretanto nesse caso a alimentação complementar se torna importante (FERREIRA

et al. 1998; LÖNNERDAL, 2000).

Nos primeiros seis meses de vida do bebê, a necessidade de ingestão de elementos essenciais ao organismo é muito crítica devido à taxa de crescimento elevada durante este período. O conteúdo de elementos essenciais no leite materno é fundamental sob o ponto de vista nutricional, uma vez que se constitui na única fonte de nutrientes para os lactentes. Deficiências severas em recém-nascidos têm sido associadas com a ausência de elementos essenciais, como ferro, zinco, cobre e selênio. Essas deficiências podem ter efeitos adversos para o crescimento e o desenvolvimento cognitivo de crianças, podendo causar doenças e mesmo a morte (DOREA, 2000).

Estes elementos essenciais são de extrema importância e são disponíveis para o organismo somente através da dieta. Como o leite materno é a principal fonte de nutrientes para os bebês durante os primeiros estágios de suas vidas, as quantidades dos elementos essenciais no leite materno são de fundamental importância.

3.1 Cálcio

O cálcio é classificado como macroelemento, tem importância vital na condutividade neural, contração muscular, secreção de hormônio e participa de vários processos metabólicos. A diminuição no cálcio livre é associada com a perda de peso, falhas no mecanismo de coagulação do sangue, distúrbios nervosos e contrações musculares convulsivas.

O recém-nascido tem aproximadamente 30 g de cálcio, o qual provém da circulação da mãe durante a gestação. Entretanto, mulheres grávidas não aumentam de forma espontânea os níveis de Ca no organismo, necessitando

assim de complemento de Ca via ingestão alimentar. Sendo assim, é o aumento na absorção durante a gestação que auxiliará a repor essa quantidade necessária para o desenvolvimento do feto. Isso pode significar um déficit no conteúdo mineral dos ossos das mães nesse período (COZZOLINO, 2007).

O leite materno contém cerca de 250-300 mg L⁻¹ de cálcio e provavelmente não sofre mudanças durante a lactação. Durante a lactação há mobilização do cálcio dos ossos com recuperação durante e após o desmame, sendo que a suplementação com cálcio não previne esta perda, nem altera a composição do leite (KALKWARF et al, 1991; STEVESON & ALLAIRE, 1991).

Geralmente, a dieta materna parece não influenciar na concentração de cálcio no leite (WHO, 2002). No entanto, estudo em Gâmbia indicou que mulheres mal nutridas com dietas com pouco cálcio, produzem níveis de cálcio inferiores no leite materno com relação às mulheres bem nutridas com Ca (LASKEY, 1990).

Segundo o IOM (1997) a ingestão adequada por dia de cálcio para os recém-nascidos de 0 a 6 meses corresponde a 210 mg e de 270 mg para recém-nascidos de 7 a 12 meses.

3.2 Cloro

O cloro é o ânion que se combina com o sódio, no líquido extracelular, e com o potássio, no meio intracelular, para manter a pressão osmótica e o equilíbrio ácido-básico do organismo. Além disso, o cloro tem função importante na digestão, uma vez que é necessário a formação do ácido clorídrico (HCl) secretado no suco gástrico, essencial para manter a acidez do estômago e ativação de enzimas durante o processo digestório gástrico (COZZOLINO, 2007).

A deficiência de cloro não ocorre sob circunstâncias normais. As perdas de cloro acompanham as de sódio, em situações de diarreia, vômitos e/ou excesso de suor.

No leite materno a concentração de cloro e sódio é mais elevada nos primeiros quatro dias pós-parto, ou seja, o leite colostro apresenta maior concentração de cloro e sódio em relação ao leite maduro (NEVILLE et al, 2001).

Os valores da ingestão adequada de cloro para recém-nascidos de 0 a 6 meses são de aproximadamente 0,18 g/dia e de 0,57 g/dia para lactentes de 7 a 12 meses (IOM, 2004).

3.3 Ferro

A principal função do ferro é o transporte de oxigênio ligado à hemoglobina, na formação de enzimas e proteínas. O ferro classifica-se em heme (origem animal) e não-heme (origem vegetal). O organismo absorve cerca de 23% do ferro-heme e 5% do não-heme.

No último trimestre da gestação ocorre maior demanda de ferro pela gestante para suprir as necessidades do feto, que adquire a maior parte das suas reservas de ferro, que atingem um valor aproximado de 340mg ao nascimento. A recomendação de ferro para gestante é de 27mg de ferro diários. A Organização Mundial da Saúde recomenda que todas as gestantes recebam suplementação de ferro no último trimestre de gestação como medida preventiva para a anemia (VITOLLO, 2003).

No estudo recente desenvolvido na cidade de São Paulo (NASCIMENTO & SOUZA, 2002), a ingestão média de ferro ingerido por gestantes foi de 10 mg/dia, valor que expressa apenas um terço das

recomendações do National Research Council (1989), enquanto Weigel et al. (1991), estudando a dieta de gestantes equatorianas, encontraram consumo médio de 18,5 mg/dia. Bellati et al. (1994) obtiveram média de 12 mg/dia e Mikode & White (1994) tiveram como resultado 14 e 16 mg/dia no segundo e terceiro trimestres de gestação, respectivamente.

O acompanhamento no pré-natal é fundamental e os estoques de ferro (ferritina sérica) devem ser avaliados ao início da gestação e no decorrer se necessário, buscando-se como primeira opção a correção da dieta. A concentração de ferro no leite materno sofre pouca alteração no período pós-parto e começa decrescer somente a partir do 5º dia (FEELY et al, 1983; ARNAUD & FAVIER, 1995).

O leite materno é uma fonte pobre de ferro e não pode ser alterada por suplementos de ferro pela mãe. As necessidades estimadas de ferro para as crianças não podem ser satisfeitas unicamente pelo leite humano, em qualquer fase da infância. O suprimento adequado de ferro pela amamentação exclusiva se dá somente nos primeiros seis meses de vida, ou seja, o ferro disponível para o crescimento e desenvolvimento deverá ser suficiente até os seis primeiros meses de vida do lactente (SILVA et al, 2007).

A concentração de ferro no leite materno diminui a partir do colostro de 0,4-0,8 mg L⁻¹ para 0,2-0,4 mg L⁻¹ no leite materno maduro (JENSEN, 1995).

Os compostos de ferro no organismo são utilizados em processos metabólicos, enzimáticos ou funções para o armazenamento de ferro (armazenado principalmente como ferritina e hemosiderina). É improvável que as funções do corpo sejam prejudicadas enquanto as reservas de ferro estiverem

disponíveis, pois quando as reservas de ferro esgotarem (deficiência de ferro) irão resultar em anemia (WHO, 2002).

A ingestão adequada de ferro segundo o IOM (2001) para recém-nascidos de 0 a 6 meses é de cerca 0,27 mg/dia e para lactentes de 7 a 12 meses o valor de ingestão adequada de 6,9 mg/dia.

3.4 Magnésio

O magnésio (Mg) é o principal cátion intracelular com concentração livre no citosol. Há aumento do interesse no papel do Mg em estudos clínicos de nutrição e fisiologia, pois este mineral afeta muitas funções celulares, incluindo transporte de íons potássio e cálcio, além de modular sinais de transdução, metabolismo de energia e proliferação celular (COZZOLINO, 2007).

O desenvolvimento de deficiências em Mg geralmente está ligado com distúrbios na absorção e/ou no aumento na excreção renal. Doenças renais, acidose metabólica e diurese causam aumento da perda de Mg, ao passo que a diarreia persistente prejudica a absorção (MORITO et al, 1999).

As concentrações de magnésio no leite humano variam em larga escala (15 a 64 mg/L) com um valor mediano de 31 mg/L. Apesar da diminuição dos níveis minerais no leite materno, com a progressão da lactação a concentração de magnésio se mantém (DÓREA, 2000).

As recomendações de ingestão de Mg propostas para as crianças de 0 a 6 meses correspondem a 30 mg/dia e de 75 mg/dia para crianças com idade entre 7 e 12 meses (IOM, 2000).

3.5 Manganês

O manganês é um elemento essencial envolvido na formação dos ossos e no metabolismo de aminoácidos, colesterol e carboidratos. A deficiência em Mn tem sido observada em várias espécies de animais, e os sinais apresentados são prejuízos no crescimento e na função reprodutora, queda na tolerância à glicose e alterações no metabolismo de carboidratos e lipídeos. Além disso, a deficiência em Mn interfere no desenvolvimento normal do esqueleto de várias espécies animais (COZZOLINO, 2007).

Os níveis de manganês no leite materno são muito baixos e pouco estudados, porém durante a lactação não é provável o uso adicional de suplementos dietéticos contendo manganês para suprir a demanda do recém-nascido (FOOD AND NUTRITION BOARD, 1989; MORGANO et al., 2005).

Segundo o Instituto de Medicina (IOM, 2002) a ingestão adequada de manganês para crianças de 0 a 6 meses corresponde 0,003 mg/dia e para crianças de 7 a 12 meses 0,6 mg/dia.

3.6 Potássio

O potássio, maior cátion intracelular do corpo, é necessário para a função celular normal. É mantido em uma concentração de, aproximadamente, 145 mmol/L de fluido intracelular e em concentrações bem menores no plasma e fluido intersticial. Pequenas alterações na concentração do potássio extracelular podem afetar a relação potássio extracelular-intracelular e, portanto, afetar a transmissão neural, a contração muscular e o tônus vascular (TRAMONTE, 2007).

Em indivíduos saudáveis, cerca de 85% do potássio ingerido é absorvido. O potássio proveniente da dieta é principalmente excretado na urina

(de 77 a 90%), sendo o restante excretado pelas fezes, com quantidades muito pequenas perdidas pelo suor (AGARWAL et al, 1994).

A deficiência moderada de potássio, que ocorre sem hipocalcemia, é caracterizada por aumento da pressão sanguínea, da sensibilidade ao sal, do risco de cálculos renais e do *turnover* ósseo, que pode ser evidenciado pela maior excreção de cálcio, formação óssea reduzida e reabsorção aumentada. Uma ingestão inadequada de potássio pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares, particularmente os acidentes vasculares cerebrais (HADDY, 2006).

No estudo desenvolvido por Bortolozo et al (2004) em banco de leite do Estado de Paraná, Brasil a média de potássio foi 355,24 mg/L em amostras de leite maduro, 437,49 mg/L em amostras de leite colostro e 443,67 mg/L para leite de mães de recém-nascidos prematuros.

Para os recém-nascidos de 0 a 6 meses a ingestão adequada de potássio é de aproximadamente 0,4 g/dia e para lactentes de 7 a 12 meses é de cerca de 0,7 g/dia (IOM, 2004).

3.7 Selênio

Selênio (Se) é um elemento essencial para o ser humano. Trata-se de uma parte integrante da enzima glutathione peroxidase, que protege contra os danos oxidativos. Como um componente do sítio ativo da glutathione peroxidase, selênio desempenha um papel antioxidante nas reações que contêm moléculas de peróxido de hidrogênio, que possam ter escapado da ação da catalase (hidroperoxidase) (ROTRUCK et al., 1973; LEVANDER et al., 1983; FANHANI & FERREIRA, 2006). Estudos indicam que selênio tem atividade anti-tumoral, e

participa em reações inflamatórias e imunológicas. Devido a essas características, selênio é utilizado na prevenção e tratamento de doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares e desordens neurológicas. Existe relação inversa entre as concentrações séricas de selênio com as incidências de câncer e doenças cardiovasculares (NÈVER, 1991).

A concentração sérica inicial de selênio nos recém-nascidos é baixa. Porém a necessidade desse elemento é mais elevada, devido a importância do selênio para o crescimento acelerado do lactente nessa fase da vida (KUMPULAINEN, 1989).

Durante a produção de leite materno, uma perda diária de 13 µg de selênio pode ocorrer em 750 ml do leite secretado. Para manter os níveis satisfatórios desse mineral no leite materno é necessária a suplementação adicional de selênio de aproximadamente 20 µg/dia pelas mães em processo de aleitamento (FOOD AND NUTRITION BOARD, 1989).

O Instituto de Medicina (2001), em resumo, declara a ingestão adequada de selênio para lactentes de 0 a 6 meses de 15 µg/dia e de 20 µg/dia para crianças de 7 a 12 meses de idade.

3.8 Sódio

O sódio é necessário para transmitir os impulsos nervosos e estimular a ação muscular, além da manutenção do equilíbrio hídrico e ácido-básico. É o cátion mais abundante no líquido extracelular do corpo humano. É também necessário ao transporte ativo de substâncias por meio das membranas celulares, sendo bem conhecida sua participação na absorção da glicose no intestino delgado (OH, 1999).

Devido ao fato do sódio ser amplamente encontrado nos alimentos e as necessidades diárias serem baixas, a deficiência desse mineral é rara.

A concentração de sódio no leite materno varia amplamente (711 $\mu\text{g/g}$ a 3090 $\mu\text{g/g}$), e a variação ocorre independentemente da idade gestacional, do período sazonal ou das condições socioeconômicas das mães (AKANLE et al., 2000; GILL et al., 2003; YAMAWAKI et al., 2005).

Os valores da ingestão adequada de sódio em recém-nascidos de 0 a 6 meses e de 7 a 12 meses são de 0,12 g/dia e 0,37 g/dia, respectivamente (IOM, 2004).

3.9 Zinco

Várias enzimas utilizam zinco (Zn) na síntese de proteínas e de ácidos nucléicos, que promovem o crescimento e reparação dos tecidos (HAMBRAEUS, 1985). A deficiência precoce é caracterizada por retardo no crescimento e alteração da função imunológica. A concentração de Zn é comumente avaliada pelo zinco sérico. No entanto, este indicador pode ser afetado por outros fatores, como por exemplo, infecção, estresse e taxa de crescimento.

É descrito que a concentração média de Zn no leite materno atinge seu pico no 2º dia pós-parto e depois começa diminuir com o progredir da lactação. Mais detalhadamente, a concentração de zinco no leite materno declina de 4-5 mg L^{-1} no leite colostro para 1-2 mg L^{-1} até os três meses pós-parto, e para ~0,5 mg L^{-1} até os seis meses de idade do lactente (WHO, 2002).

Os recém-nascidos apresentam um declínio fisiológico nos estoques hepáticos de zinco. Em países em desenvolvimento, o armazenamento desse nutriente em lactentes ainda pode ser reduzido em virtude do baixo peso ao

nascer e do deficiente estado nutricional materno, ocasionando anormalidades da função imune e aumento da morbidade por doenças infecciosas. Portanto, a melhora do estado nutricional de zinco contribui para a diminuição da mortalidade infantil por diarreia e doenças respiratórias (EUCLYDES, 2000).

A deficiência de zinco é responsável por diversas anormalidades bioquímicas e funcionais no organismo humano, devido à participação desse micronutriente em uma ampla gama de processos metabólicos. Devido ao crescimento rápido na infância e em fases onde as necessidades apresentam-se aumentadas como na gestação e lactação, ocorrem prejuízos na função imune e nos resultados obstétricos. As consequências da carência nutricional podem ser corrigidas através de suplementação específica (IOM, 2001).

A ingestão adequada de zinco para lactentes de 0 a 6 meses corresponde a 2,0 mg/dia e 3,0 mg/dia para lactentes de 7 a 12 meses de idade (IOM, 2001).

Na Tabela 3.1 encontra-se o resumo dos valores da ingestão adequada para lactentes de 0 a 6 meses de idade para os seguintes elementos Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn, de acordo com a WHO (2002).

Tabela 3.1 – Valores de ingestão para lactentes de 0 a 6 meses

Elemento	Valor de ingestão adequada mg/dia
Ca	210
Cl*	0,18
Fe	0,27
K*	0,4
Mg	3,0
Mn	0,003
Na*	0,12
Se**	15
Zn	2,0

* em g/dia; ** em µg/dia

CAPÍTULO 4

4. Revisão da literatura

4.1 Leite materno e fórmula infantil

As concentrações dos elementos traço em leite materno têm sido determinadas em muitos estudos nos últimos anos (BENEMARIYA et al, 1995; ROSSIPAL & KRACHLER, 1998; SILVESTRE et al, 2000; AL-AWADI & SRIKUMAR, 2000; WAPPELHORST et al, 2002; YAMAWAKI et al, 2005).

Para obter dados comparáveis e valores de referência confiáveis o tempo exato do período de amostragem deve ser especificado indicando o estágio da lactação (coloostro, intermediário e/ou maduro). Cu, Zn e Se foram determinados em 47 amostras de leite materno de cinco mulheres de classe média de Burindi, África. As amostras foram coletadas a partir do 2^o dia até o 10^o mês após o parto. Os níveis obtidos foram comparáveis com os dados da literatura, sendo que apenas o Se apresentou níveis mais baixos (BENEMARIYA et al, 1995).

Cálcio, cobre, ferro, fósforo, magnésio e zinco foram determinados em amostras de leite materno de 72 mães venezuelanas, na cidade de Caracas. As amostras foram coletadas durante os três estágios da lactação: coloostro (3^o dia), transitório (7^o dia) e leite maduro (21^o dia). As mudanças mais significativas na concentração dos elementos estudados foram observadas durante as duas primeiras semanas de lactação e estabilizaram durante a terceira semana. A

média das concentrações dos elementos Zn, Cu, Fe, Ca, P e do Mg obtidas nas amostras do colostro foram de: $7,1 \pm 2,5 \text{ mg ml}^{-1}$; $0,52 \pm 0,15 \text{ mg ml}^{-1}$; $0,49 \pm 0,14 \text{ mg ml}^{-1}$; $214 \pm 62 \text{ mg ml}^{-1}$, $107 \pm 27 \text{ mg ml}^{-1}$ e $33,3 \pm 7,5 \text{ mg ml}^{-1}$, respectivamente. As amostras do leite transitório a média das concentrações obtidas para os elementos estudados foram: $4,0 \pm 1,0 \text{ mg ml}^{-1}$; $0,50 \pm 0,10 \text{ mg ml}^{-1}$; $0,38 \pm 0,08 \text{ mg ml}^{-1}$, $292 \pm 62 \text{ mg ml}^{-1}$; $213 \pm 36 \text{ mg ml}^{-1}$ e $30,4 \pm 5,2 \text{ mg ml}^{-1}$, respectivamente. As amostras do leite maduro os resultados foram: $2,8 \pm 2,7 \text{ mg ml}^{-1}$; $0,47 \pm 0,08 \text{ mg ml}^{-1}$; $0,36 \pm 0,09 \text{ mg ml}^{-1}$; $244 \pm 49 \text{ mg ml}^{-1}$; $175 \pm 35 \text{ mg ml}^{-1}$ e $25,2 \pm 3,3 \text{ mg ml}^{-1}$. A faixa de variação na concentração dos elementos traço estudada (Cu, Fe e Zn) pode ser considerada normal com relação a progressão da lactação. Para os elementos maiores (Ca, P e Mg) os resultados obtidos são similares aos relatados em outros países. Portanto, conclui-se que o estado nutricional materno foi adequado para satisfazer as exigências nutricionais dos lactentes no primeiro estágio de vida (ITRAGO et al, 1997).

Al-Awadi & Srikumar (2000) no Kuwait analisaram elementos traço (Zn, Fe e Cu) no leite materno no período de 0 a 18 meses pós-parto e o critério de inclusão foi o aleitamento materno de no mínimo duas semanas. As voluntárias foram selecionadas entre 17 mães kuwaitianas e 17 não-kuwaitianas, totalizando 34 voluntárias entre 25 a 40 anos. Foram determinadas também as concentrações dos elementos no plasma sanguíneo por Espectrometria de Absorção Atômica. Os resultados mostraram que somente a concentração de Zn no plasma de mulheres kuwaitianas foi significativamente alta com relação às mulheres não-Kuwaitianas.

As técnicas de INAA (Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental) e PIXE (Emissão de Raios X Induzida por Partículas) foram utilizadas para determinar a concentração de 13 elementos em leite materno durante a primeira semana de lactação de 16 mães pré-termo e 20 mães termo, e também foram analisadas fórmulas infantis para recém-nascidos com baixo peso ao nascer do Reino Unido e da Nigéria. Os resultados do estudo mostraram que no leite pré-termo, as concentrações de Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, e Zn são altamente significantes, enquanto que para o leite de mães a termo foram significativamente altas as concentrações de P e Br. As concentrações de Fe e Zn foram encontrados significativamente altas em mães pré-termo comparadas com o leite termo. Entretanto, a concentração de Fe no leite materno foi encontrada abaixo em relação ao valor determinado nas fórmulas infantis. A concentração de Zn nas fórmulas infantis foi próxima a do leite materno. Entretanto, foi observado que os níveis de Zn declinam com a progressão da lactação, o que pode resultar na deficiência de Zn nos lactentes durante o crescimento (AKANLE et al, 2000).

Não existem trabalhos brasileiros que analisam leite materno colostro diretamente das mães, a maioria dos trabalhos apresentam os resultados para leite materno coletados em banco de leite. Exceto para Costa et al (2002) determinaram a concentração de Fe, Cu e Zn em leite colostro de 50 mães brasileiras. As amostras foram coletadas do 1º ao 4º dia pós-parto. Os níveis de elementos traço foram determinados pelo método de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF). Os valores obtidos foram: $1,72 \pm 1,01 \text{ mg L}^{-1}$ para o Fe; $0,54 \pm 0,29 \text{ mg L}^{-1}$ para o Cu e $6,97 \pm 2,82 \text{ mg L}^{-1}$ para o Zn. As concentrações determinadas dos elementos foram comparadas com os valores do leite colostro informados pela literatura.

No Paquistão, Gill et al (2003) estudaram 18 elementos traço em leite materno de 23 voluntárias pela técnica de Análise por Ativação com Nêutrons seguida de separação radioquímica. Um questionário foi preparado com dados individuais de cada voluntária, e com base nele foram categorizados dois grupos, mães de baixa-renda e mães de renda-média. Os dados fornecem a base de valores desses elementos no leite materno de grupos de renda baixa e média de mães da região. Os resultados obtidos mostram uma boa compatibilidade com os dados reportados pela OMS sobre a composição elementar de leite materno a partir de diferentes regiões.

Outro estudo realizado no Brasil (COSTA et al., 2003) avaliou o efeito da pasteurização nas concentrações do ferro, cobre e zinco em amostras de colostro de mães de recém-nascidos prematuro (PT) e a termo (T) que são armazenadas em banco de leite. As amostras foram coletadas do 1º dia ao 7º dia após o nascimento. O processo de pasteurização é utilizado em bancos de leite com o objetivo de inativar 100% dos microrganismos patogênicos e 99,99% da microbiota saprófita. Os elementos traço foram determinados usando a técnica da Fluorescência do Raio X por Reflexão Total (radiação de sincrotron). Os resultados de Fe, Cu e Zn (média±desvio-padrão) foram obtidos para o colostro de recém-nascidos pré-termo e a termo, não-pasteurizado e pasteurizado, respectivamente: (PT) $1,969 \pm 0,73$ mg/l e $1,719 \pm 0,70$ mg/l de Fe; $0,679 \pm 0,28$ e $0,649 \pm 0,28$ mg/l de Cu; $5,559 \pm 2,71$ e $5,399 \pm 2,73$ mg/l de Zn; (T) $1,719 \pm 1,01$ mg/l e $1,469 \pm 0,99$ de Fe; $0,549 \pm 0,29$ e $0,499 \pm 0,19$ mg/l do Cu; $6,979 \pm 2,82$ e $6,759 \pm 2,62$ mg/l de Zn. Houve redução significativa nos níveis de Fe, Cu e Zn nas amostras de colostro pasteurizado. Estes resultados sugerem que apesar da diminuição nos níveis de Fe, Cu e Zn nas amostras de colostro pasteurizado, os

valores estão dentro do aceitável para as necessidades nutricionais específicas dos recém-nascidos durante o período de lactação estudado.

Yamawaki et al (2005) analisaram a composição do leite materno com relação aos macronutrientes, minerais e elementos traço em dois períodos (verão e inverno) de 1197 mulheres abaixo de 40 anos de idade, que não possuíam o hábito de fumar e de usar suplemento vitamínico. O leite foi coletado do 1º ao 365º dia pós-parto de mães de várias regiões do Japão. A técnica analítica utilizada para determinar a composição dos minerais e dos elementos traço foi a Espectrometria de Emissão Atômica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplada (ICP OES) e somente para o cloro (Cl) foi medido a partir da Titulação Colorimétrica. Os resultados estão de acordo com as publicações sobre a composição do leite materno, mas ficou claro que existe uma grande variação na composição relativa dos aminoácidos livres e dos elementos traço, como Cr, Mn, Fe, Cu, Zn e Se. O estudo confirmou que a composição do leite materno é afetada por fatores como a fase de aleitamento, e varia de acordo com o indivíduo.

Amostras do leite materno foram coletadas de 25 mães durante as três primeiras semanas de lactação no Hospital Central, Tripoli, Líbia. As amostras de leite materno foram analisadas pela Análise por Ativação com Nêutron (NAA) para três elementos traço (Cu, Se, e Zn). A média das concentrações de Cu, Se, e Zn foram de $0,84 \pm 0,06$ mg/L, $104 \pm 9,46$ µg/L, e $16,1 \pm 2,67$ mg/L para Cu, Se, e Zn, respectivamente. Verificou-se uma diminuição dos níveis dos elementos durante a progressão da lactação. Os teores de cobre e o zinco no leite de mães líbias estavam de acordo com os teores relatados em outros países, exceto para Se que estava alto. A

ingestão diária de Cu foi mais elevada do que o valor recomendado (RDA – dietary reference intakes). Os valores para selênio e zinco foram mais elevados em relação aos valores da RDA, mas estavam dentro dos níveis toleráveis (HANNAN et al, 2005).

A técnica ICP MS foi utilizada para determinar as concentrações de elementos traço (Mn, As, Pb, Co, Ni, Cu, Zn e Se) em amostras de leite materno coletadas de um grupo de mulheres portuguesas saudáveis, no 2º dia após o parto (colostro; n= 34) e em amostras de 1 mês após o parto (leite maduro; n= 19) e em amostras de sangue (n= 44), coletadas no 2º dia após o parto. Ambas as amostras foram analisadas igualmente para os mesmos elementos traço. Nenhuma correlação foi observada entre os níveis dos elementos traço analisados no sangue e nas amostras do leite colostro. Todos os elementos estudados, com exceção do Co, Pb e Ni, mostraram uma tendência significativa para uma diminuição na concentração no leite durante o primeiro mês de lactação e houve também a tendência para o Zn, cujos níveis diminuíram aproximadamente 23% para o colostro e 44% para o sangue. Com exceção do Co ($r = 0,607$) e do Zn ($r = 0,487$), nenhuma correlação significativa foi observada ao comparar os níveis de cada elemento traço entre amostras de colostro e maduro (ALMEIDA et al, 2008).

Yousef et al (2008) determinaram os teores de elementos traço no leite materno e no plasma de mulheres com recém-nascidos de 4 a 80 semanas pós-parto. As amostras foram preparadas para serem analisadas por ICP-MS. Um grupo de 209 mulheres concordou participar do estudo, sendo 68 dos Emirados Árabes Unidos (UAE- United Arab Emirates), 124 doadoras eram de outras nacionalidades e 17 não preencheram os requisitos do questionário. A

concentração de diferentes elementos traço no sangue e o leite materno variou pouco entre as mulheres UAE e aquelas de outras nacionalidades. Porém, o molibdênio, o cromo e o arsênio aumentaram significativamente conforme progredia a lactação. Comportamentos opostos tiveram o manganês, cobre e zinco, que diminuíram significativamente com a progressão da lactação. As concentrações dos elementos traço no leite e no sangue materno foram comparáveis com valores publicados na literatura.

Nos últimos anos, tem havido interesse em analisar fórmulas infantis, com o objetivo de comparar os valores da concentração dos elementos essenciais com a rotulagem das fórmulas e com a legislação vigente no país que comercializa as fórmulas.

Lönnerdal et al (1983) compararam os teores determinados nas fórmulas infantis com valores do leite materno. Determinaram as concentrações de Fe, Zn, Cu e Mn em 53 amostras de leite materno e 41 fórmulas infantis especiais produzidas em 8 países (Estados Unidos, Suécia, Alemanha Ocidental, Japão, Holanda, Inglaterra, França e Noruega). Várias fórmulas infantis tiveram concentrações menores de elementos traço do que o leite materno. Os intervalos de concentrações encontrados nas fórmulas foram os seguintes: Fe: 0,01 a 57,5 mg L⁻¹; Cu: 0,01 a 2,14 mg L⁻¹; Zn: 0,10 a 13,5 mg L⁻¹; e Mn: 0,01 a 7,8 mg L⁻¹. Apenas as fórmulas produzidas nos Estados Unidos tiveram a média de Zn e Cu acima do mínimo recomendado pelo Comitê de Nutrição da Academia Americana de Pediatria (CON / AAP, 1976) ou pelo *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 1982). Houve uma grande variação nas concentrações dos elementos traço nas fórmulas. Enquanto que as relações das médias dos elementos no leite materno variaram de 3,3 a 10, 2,5 a 10, e de 25 a 100, respectivamente para Zn:Cu,

Zn:Fe, e Fe:Mn, para as fórmulas variaram de 0,4 a 74, 0,02 a 40, e 0,04 a 425. Estes resultados indicam que mais atenção deve ser dada aos níveis dos elementos traço nas fórmulas infantis.

Kashlan et al (1991) relatam os níveis de elementos traço (Zn, Cu, Mn e Fe) e elementos maiores (Na, K, Ca, P, Mg) em 23 fórmulas infantis à base de leite de vaca e 6 à base de soja comercializadas no Kuwait. Os resultados desse estudo mostraram que, em geral, os teores dos elementos estão de acordo com as recomendações do *Codex Alimentarius*, exceto para poucos produtos que apresentaram baixos teores de Fe, Zn e Cu. Variação em relação ao rótulo foi mais elevada para o Mn. A maioria das fórmulas à base de leite de vaca tinha a relação Zn:Cu nos limites acima relatada para o leite materno e todas as fórmulas tinham relações de Fe:Zn e Fe:Mn superiores aos informados para o leite materno. A concentração de Cu foi baixa e uma grande variação na concentração de Mn parecem ser os principais inconvenientes, para manter uma boa qualidade da composição elementar das fórmulas infantis comercializadas no Kuwait.

Abbé et al (1996) determinaram Se em 14 fórmulas infantis do Canadá e compararam com o teor de Se em amostras de leite materno maduro. Os resultados mostraram que várias fórmulas infantis vendidas no Canadá são deficientes em Se. Esses produtos não podem oferecer Se em quantidades adequadas para atender as necessidades das crianças, particularmente durante os primeiros seis meses de vida, uma vez que é a principal fonte primária desse elemento para os recém-nascidos. Os teores de Se no leite materno de mães canadenses foram semelhantes aos relatados nos Estados Unidos e em muitos outros países. No entanto, é necessário um estudo maior para determinar a

variabilidade geográfica, para verificar se os teores de Se diferem entre as regiões do Canadá.

Torres et al (1999) estimaram o teor de Se em amostras de leite materno (coloostro, transitório e maduro) em mães da província de Valência e Castellon e analisaram 18 fórmulas infantis, entre elas à base de leite de vaca e à base de soja, usando o método de Espectrometria de Absorção Atômica (AAS). Para os resultados do leite materno, os valores médios foram de $11,4 \pm 3,7$ e $10,7 \pm 4,6$ ng ml⁻¹ para coloostro e leite transitório, $8,4 \pm 3,4$ e $5,3 \pm 1,9$ ng ml⁻¹ para o leite maduro, de 1 mês e até 2 meses, respectivamente. Selênio foi estimado assumindo que os bebês foram alimentados exclusivamente de leite materno, sem alimentos complementares. Esses valores são semelhantes aos relatados por outros pesquisadores da Europa, e mais baixos do que os Estados Unidos, Japão e a Coréia. As amostras das fórmulas infantis analisadas variaram de 2,7 a 9,6 ng ml⁻¹ e de 1,8 a 7,5 ng ml⁻¹ para as fórmulas à base de soja e à base de leite de vaca, respectivamente. Esses valores de Se estão abaixo da recomendação de 10 µg, correspondente à dose diária recomendada para crianças de 0 a 6 meses.

Ikem et al, (2002) analisaram 17 diferentes amostras comercializadas nos principais mercados da Nigéria, Reino Unido e dos EUA. Foram determinados os teores dos elementos essenciais (Ca, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, e Zn) e não essenciais (Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl, U, e V) e estimaram a ingestão destes elementos nas fórmulas infantis. A técnica utilizada para determinar os elementos de interesse foi ICP OES. Os resultados das fórmulas infantis à base de proteína de soja geralmente apresentaram níveis mais elevados dos elementos com relação às fórmulas à base de leite de vaca. As

concentrações do alumínio e o bário estavam no limite máximo tolerável. O tálio estava acima das recomendações para algumas amostras de fórmula infantil. O cádmio, chumbo, níquel e o cromo estavam abaixo de seus limites toleráveis. Algumas amostras apresentaram baixos índices nutritivos quando comparados com as recomendações dietéticas (RDA) e com a referência dietética (DRI). Quatro marcas comercializadas no Reino Unido e 3 nos EUA estavam de acordo com as referências dietéticas para o zinco. Duas marcas do Reino Unido apresentaram valores de ferro abaixo do recomendado de 5,03 mg/dia e 10 marcas também do Reino Unido apresentaram valores de magnésio abaixo dos valores recomendados de ingestão. Entretanto, todas as marcas apresentaram valor de cálcio semelhante ao da referência dietética (DRI) de 210 mg/dia.

Melo et al (2008) determinaram a concentração de minerais essenciais, elementos traço e elementos tóxicos (Al, Co, Cr, Cu, Ni, Mo, Ca, Fe, K, Mg, Na, Zn, As, Cd, Hg e Pb) em 76 produtos infantis (fórmula infantil, papas de aveia e purê de frutas) comercializados na Noruega por HR-ICP-MS. Os produtos foram coletados de três fornecedores no mercado norueguês (Nestlé, Tine e Nyco Pharma). Para todos os produtos os limites estavam dentro do valor superior tolerável para os minerais e para os elementos traço analisados; para os elementos tóxicos os níveis estavam muito abaixo do limite máximo. Segundo os autores uma dieta baseada unicamente em produtos alimentícios industriais comercializados na Noruega fornecerá a ingestão suficiente de minerais e dos elementos traço.

Sziklai-Laszlo et al (2009) determinaram e compararam os níveis de Se e os índices da vitamina E (α - e γ - tocoferol) no leite materno e nas fórmulas infantis disponíveis no comércio da Hungria. Os teores de Se foram determinados

por Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA) e as concentrações da vitamina E α - e γ -tocoferol foram determinadas pela Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC). A concentração média de Se foi de $17,4 \pm 2,8 \mu\text{g/L}$ no leite transitório e $13,8 \pm 2,3 \mu\text{g/L}$ no leite maduro. As fórmulas infantis de partida, de seguimento e as fórmulas especializadas apresentaram baixos teores de Se em relação ao leite materno. No leite transitório, a ingestão de Se foi mais elevada ($14 \mu\text{g/dia}$) em relação ao leite maduro ($11 \mu\text{g/dia}$). A ingestão diária de Se em crianças húngaras estavam dentro da escala dietética recomendada (RDA). Os teores de vitamina E no leite materno foram similares aos valores dos leites transitório e maduro. O leite maduro teve a concentração de α - tocoferol de $3,30 \pm 1,13 \text{ mg/L}$ e este valor foi significativamente mais elevado do que aquele encontrado nas fórmulas de partida ($1,98 \pm 1,57$), fórmulas de seguimento ($1,77 \pm 0,78$), e nas fórmulas especializadas ($1,03 \pm 0,74$). Este estudo sugere que para o desenvolvimento ideal das crianças as fórmulas têm que possuir concentrações destes antioxidantes em um nível que seja comparável aquele do leite materno. O mesmo se aplica em relação aos teores dos elementos maiores e traço essenciais, como Cu, Fe, Zn entre outros.

Portanto, verifica-se a preocupação dos pesquisadores nas análises de fórmulas infantis, devido à sua importância no primeiro estágio após o nascimento e principalmente com relação à substituição do leite materno.

CAPÍTULO 5

5. METODOLOGIA

5.1 Princípios do método de Análise por Ativação com Nêutrons

A Análise por Ativação com Nêutrons (NAA) é um método analítico que se diferencia de outros métodos analíticos usuais, em virtude de basear-se em reações que ocorrem com núcleos atômicos e não com elétrons orbitais (BODE, 1996). Em geral, a irradiação da amostra é realizada com nêutrons térmicos gerados em reator nuclear ocorrendo à formação de isótopos radioativos. Dessa forma, através da reação nuclear é possível identificar os elementos presentes na amostra por meio das energias dos raios gama e pelas meias-vidas dos radionuclídeos formados (PARRY, 2003).

A probabilidade de que ocorra a reação nuclear, a abundância isotópica do núcleo alvo e a meia-vida do radioisótopo formado devem ter uma ordem de grandeza suficiente para que a análise se torne viável. A Análise por Ativação é um dos métodos mais importantes dentre os disponíveis para a análise de traço. Uma das suas principais vantagens é a sua capacidade de determinação multielementar com alta sensibilidade ($\mu\text{g g}^{-1}$ a ng g^{-1}) e a pequena quantidade de amostra requerida (~ 50 a 200 mg).

Na irradiação, quando um nêutron interage com um núcleo alvo por meio de uma colisão inelástica, forma-se um núcleo composto num estado excitado. A energia de excitação do núcleo composto é devido à energia de ligação do nêutron com o núcleo e à energia cinética do nêutron. O núcleo

composto, quase que instantaneamente, sofre des-excitação para uma configuração mais estável, por meio da emissão de raios gama pronto característicos. O tempo de vida do núcleo composto é da ordem de 10^{-16} a 10^{-14} segundo. Em muitos casos, esta nova configuração produz um núcleo radioativo, que também sofre des-excitação por meio da emissão de um ou mais raios gama de decaimento característico, mas a uma razão mais lenta, de acordo com o tempo de meia-vida do nuclídeo radioativo. Este processo de interação para formação de um nuclídeo radioativo pode ser representado pelo esquema da reação nuclear apresentado na Figura 5.1.

FIGURA 5.1 – Esquema da captura radioativa (IAEA, 1990)

Dentre as reações com nêutrons, particularmente a do tipo (n, γ) é de grande interesse, pois, para a grande maioria dos elementos essa é a reação mais favorável para nêutrons térmicos, embora haja exceções no caso dos elementos extremamente leves. Normalmente, os produtos dessa reação ao decaírem emitem raios gama característicos, que podem ser eficientemente detectados, permitindo além da identificação da composição da amostra, a sua quantificação.

A reação nuclear mais comum utilizada em NAA é a reação de captura de nêutrons térmicos, ou a reação (n, γ) . Como exemplo, uma reação típica de captura de um nêutron térmico por um núcleo atômico é mostrado a seguir:

Na prática, pode-se obter a ativação com nêutrons nos elementos por três vias: o método semi-paramétrico, o método absoluto e o método comparativo.

Método semi-paramétrico (k_0 standardization)

Este método vem sendo utilizado de forma crescente pelos laboratórios que fazem ativação neutrônica em todo mundo. A principal vantagem deste método é eliminar as incertezas provenientes da utilização de um padrão e da utilização de parâmetros nucleares extraídos da literatura. Porém, os constituintes do k_0 que são encontrados na literatura, nem sempre se encontram com uma boa precisão (ZAMBONI & GENEZINI, 2007).

Método Absoluto (paramétrico)

Este método de análise é pouco utilizado na prática, pois necessita do conhecimento do fluxo de nêutrons e das secções de choque envolvidas, ou seja, para a maioria dos parâmetros nucleares utilizados para obter a concentração dos elementos não é conhecido com exatidão, o que torna este método absoluto bastante limitado (YORIYAZ et al., 2000).

Na Análise por Ativação, o primeiro fenômeno que ocorre é a formação do radioisótopo, representado por meio de uma reação nuclear:

Em seguida, tem-se o decaimento do radioisótopo formado:

O número de radioisótopos formados *b é proporcional à secção de choque (σ), ao fluxo de nêutrons (ϕ) e ao número de átomos do núcleo alvo (N_a).

Sendo assim, a taxa de formação do radioisótopo *b em função do tempo pode ser expressa pela relação:

$$d \frac{N_b}{dt} = N_a \phi \sigma \quad (4)$$

Onde: N_a = número de átomos do núcleo alvo a ; ϕ = fluxo de nêutrons; σ = secção de choque da reação.

Mas o radioisótopo *b sofre decaimento a uma taxa de $\lambda_b N_b$, portanto a formação total de *b será:

$$d \frac{N_b}{dt} = N_a \phi \sigma - \lambda_b N_b \quad (5)$$

Onde: λ_b = constante de decaimento do radioisótopo formado.

Integrando a equação (5) desde o início da irradiação ($t = 0$) até o tempo final da irradiação ($t = t_i$), e considerando que no instante $t = 0$, $N_b = 0$, temos:

$$N_b = \frac{N_a \phi \sigma [1 - e^{-\lambda t_i}]}{\lambda_b} \quad (6)$$

Essa equação nos permite calcular o número de átomos radioativos formados (N_b) para um tempo de irradiação qualquer (t_i), desde que se conheça o valor de λ_b , N_a , ϕ e σ .

Usualmente, o que se determina não é a quantidade N_b formada na irradiação, mas sim a taxa de decaimento de N_b , conhecida por atividade (A):

$$A = \frac{dN_b}{dt} = \lambda N_b \quad (7)$$

O número de átomos N_a do núcleo alvo pode ser expresso em função da sua massa m :

$$N_a = \frac{N_{av}}{M} \cdot I \cdot m \quad (8)$$

Onde: N_{av} = o número de Avogrado; M = massa atômica do elemento; I = abundância isotópica do núcleo alvo a.

Substituindo as (7) e (8) na equação (6) temos que:

$$A = \frac{\sigma \cdot \phi \cdot N_{av} \cdot I \cdot m}{M} (1 - e^{-\lambda t_i}) \quad (9)$$

A equação (9) mostra que a atividade produzida é diretamente proporcional à quantidade do núcleo alvo, desde que as condições de irradiação permaneçam inalteradas.

A atividade induzida A em um elemento alvo pode ser medida experimentalmente, após um tempo de irradiação t_i , por um meio de um sistema de detecção adequado. Sendo ϵ a eficiência do sistema de detecção, a equação (9) para a reação em questão é dada por:

$$A = \frac{\epsilon \cdot \sigma \cdot \phi \cdot N_{av} \cdot I \cdot m}{M} (1 - e^{-\lambda t_i}) \quad (10)$$

Onde: A = atividade induzida após o tempo de irradiação, em contagens por segundo; ϵ = eficiência do sistema de detecção; σ = seção de choque de captura de nêutrons térmicos, em cm^2 ; ϕ = fluxo nêutrons térmicos incidentes no núcleo alvo, em $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$; N_{av} = número de Avogrado; I = abundância isotópica do núcleo alvo; m = massa do núcleo alvo, em g; M = massa atômica do núcleo alvo; t_i = tempo de irradiação, em segundos; λ = constante de decaimento do núcleo produto, em s^{-1} , sendo $\lambda = \frac{0,693}{t_{1/2}}$.

Convém ressaltar que, normalmente, a atividade induzida A em um elemento alvo não é medida experimentalmente imediatamente após o tempo de irradiação t_i , existe um intervalo de tempo t_d entre o final da irradiação e o tempo de início da medida experimental. Levando-se em consideração o tempo de decaimento t_d , a equação (10) torna-se:

$$A = \frac{\varepsilon \cdot \sigma \cdot \phi \cdot N_{av} \cdot I \cdot m}{M} (1 - e^{-\lambda b t_i}) \cdot e^{-\lambda t_d} \quad (11)$$

Teoricamente é possível o uso do método absoluto na análise experimental. Entretanto, devido à imprecisão dos parâmetros nucleares o método instrumental comparativo é normalmente utilizado.

Método de Análise por Ativação Instrumental Comparativo (INAA)

Esta técnica tem sido utilizada com sucesso em inúmeros experimentos realizados no Laboratório de Ativação Neutrônica (LAN) do IPEN/CNEN – SP (FRAZÃO et al., 2007; MOURA et al., 2007; NUNES et al., 2007; SAIKI et al., 2007; SANTOS et al., 2007b; MAIHARA et al., 2008).

O método instrumental comparativo é o mais utilizado para a quantificação de radionuclídeos. Neste processo de ativação, amostra e padrão (com teor conhecido do elemento a ser determinado) devem ser irradiados sob a mesma intensidade do feixe de nêutrons, uma vez que o freamento que a partícula sofre no alvo e no padrão é diretamente relacionado à composição química de ambos. Após a irradiação, amostra e padrão são submetidos à contagem utilizando o mesmo arranjo experimental. Desta forma, a determinação da concentração do elemento na amostra é obtida através de comparação entre

as atividades induzidas na amostra e no padrão, uma vez que a taxa de emissão de radiação por um material é proporcional ao seu número de átomos (ZAMBONI & GENEZINI, 2007).

O método instrumental comparativo não exige o conhecimento dos valores dos parâmetros nucleares mostrados na equação (11), tornando mais simples o cálculo da concentração de um elemento presente na amostra.

De acordo com a equação (11) e considerando o tempo de decaimento da amostra e do padrão, respectivamente, como t_{da} e t_{dp} (como $t_{da} \neq t_{dp}$, pois a taxa de contagem da amostra e do padrão não são obtidas simultaneamente), a atividade induzida A_a em um elemento da amostra e a atividade induzida A_p em um mesmo elemento do padrão são dadas por:

$$A = \frac{\varepsilon \cdot \sigma \cdot \phi \cdot N_{av} \cdot I \cdot m}{M} (1 - e^{-\lambda b t_i}) \cdot e^{-\lambda t_{da}} \quad (12)$$

e

$$A = \frac{\varepsilon \cdot \sigma \cdot \phi \cdot N_{av} \cdot I \cdot m}{M} (1 - e^{-\lambda b t_i}) \cdot e^{-\lambda t_{dp}} \quad (13)$$

Dividindo-se a equação (12) pela equação (13) temos:

$$\frac{A_a}{A_p} = \frac{m_a}{m_p} \cdot \frac{e^{-\lambda t_{da}}}{e^{-\lambda t_{dp}}} \quad (14)$$

e

$$M_a = \frac{m_p \cdot A_a \cdot e^{\lambda(t_{da} - t_{dp})}}{M} \quad (15)$$

A concentração C_a do elemento contido na amostra é dada por:

$$C_a = \frac{m_a}{M_a} \quad (16)$$

Substituindo a equação (15) na equação (16):

$$C_a = \frac{m_p \cdot A_a \cdot e^{\lambda(t_{da} - t_{dp})}}{M_a \cdot A_p} \quad (17)$$

Onde: m_p = massa do elemento no padrão; A_a = taxa de contagens do elemento na amostra para o tempo de decaimento toda, em contagens por segundo; t_{da} = tempo de decaimento da amostra, em segundos; t_{dp} = tempo de decaimento do padrão, em segundos; M_a = massa total da amostra; A_p = taxa de contagens do mesmo elemento no padrão para o tempo de decaimento t_{dp} ; λ = constante de decaimento do núcleo produto, em s^{-1} , sendo $\lambda = \frac{0,693}{t_{1/2}}$; $t_{1/2}$ = meia-vida do núcleo produto, em segundos.

A simplicidade deste cálculo é uma grande vantagem do método comparativo, pois não é necessário conhecer todos os parâmetros nucleares envolvidos no processo. De um modo geral, a massa m_a de uma amostra é medida e depois irradiada simultaneamente com um material cuja concentração do elemento a ser determinado já é conhecida (padrão do elemento). Em seguida, obtém-se a taxa de contagem para a amostra e para o padrão utilizando-se um

sistema de detecção adequado. A comparação entre estas taxas de contagens é a base para o cálculo da concentração do elemento contido na amostra.

A INAA é uma técnica não destrutiva, ou seja, não há tratamento químico na amostra, mas a integridade física da amostra pode, no entanto, ser alterada por danos causados pela radiação ou pela presença de radiatividade de radioisótopos de meia-vida longa.

A principal vantagem dessa técnica é a determinação das concentrações de cerca de 20 a 30 elementos numa única amostra. Para uma análise instrumental completa, as amostras podem ser irradiadas em diversos tempos, como 2 a 5 minutos (irradiações curtas), onde radioisótopos de meias-vidas curtas são determinados, e 8 a 16 horas, onde os radioisótopos de meias-vidas de dias a anos são determinados. Além disso, é possível utilizar pequena quantidade da amostra, em geral de 50 a 200 mg.

Uma desvantagem no método de Análise por Ativação é que, de modo geral, os elementos leves com número atômico menor que 10 ($Z < 10$) não podem ser determinados pela irradiação com nêutrons num reator. Outra desvantagem é a necessidade de um reator nuclear com um fluxo intenso de nêutrons, o que limita a aplicação da técnica e o alto custo empregado na manutenção dos equipamentos para manter as condições ideais.

CAPÍTULO 6

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Leite Materno

6.1.1 Parceria com o Instituto da Criança do HCFUSP

O desenvolvimento da pesquisa seguiu as normas do comitê de ética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr –HCFMUSP). Esse trabalho teve como principais parceiros do ICr- HCFMUSP, Dr. Artur Figueiredo Delgado; Dra. Jane Oba - InCor-HCFMUSP e Dra. Maria Esther Rivero Cecon, os quais entraram em contato com os devidos setores para o encaminhamento e aprovação da pesquisa. Por motivos não declarados pelo comitê de ética, a coleta foi direcionada para um dos hospitais gerenciado pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, como segue abaixo as características do local da coleta, o Hospital Estadual Sapopemba (HES).

6.1.2 Características gerais do local da coleta de leite materno – Hospital Estadual Sapopemba

O HES foi criado pelo Decreto 47.432 de 10 de dezembro de 2002, na Coordenadoria de Saúde da Região Metropolitana da Grande São Paulo, com a finalidade de prestar assistência médico-hospitalar, em regime de emergência e internação, nas áreas clínica-médica, clínica-cirúrgica, clínica ginecológica e

obstetrícia, clínica pediátrica, clínica psiquiátrica e terapia intensiva, visando à reabilitação da população como um todo.

O HES foi inaugurado em 5 de abril de 2003, em uma área de 13.700 m², distribuídos em 12 pavimentos e 220 leitos.

Em 7 de abril de 2003, foi firmado o Convênio de Parceria na Gestão de Serviços Públicos de Saúde entre a Secretaria de Estado da Saúde e o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, objetivando a operacionalidade do HES.

Na primeira fase de funcionamento, o Hospital contava com uma equipe de 110 funcionários do Hospital das Clínicas que atendiam exclusivamente parturientes. As demais especialidades médicas foram sendo implantadas progressivamente: clínica geral, clínica cirúrgica, clínica pediátrica, unidades de terapia intensiva, ginecologia, neonatologia e psiquiatria.

Em 13 de abril de 2006, através do Decreto 50.729, o HES, passou a denominar-se Hospital Estadual Sapopemba “Professor Doutor Antonio Barros de Ulhôa Cintra”.

O Hospital é localizado na Zona Leste de São Paulo em uma região bastante carente entre os bairros de São Matheus e Carrão; a população que frequenta o Hospital geralmente mora ao redor do mesmo. Na Figura 6.1 estão dispostos o mapa de localização e a fotografia do HES.

FIGURA 6.1 – Localização do Hospital Estadual Sapopemba

6.1.3 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP - Anexo 1) seguindo todas as normas estabelecidas pela instituição.

6.1.4 Características da população estudada

A Tabela 6.1 apresenta os dados relevantes das mães que participaram deste estudo.

TABELA 6.1– Dados das mães coletados do questionário aplicado

Código das amostras	Dados materno	
	Idade materna^a	Número de gestação
T1	23	2
T2	16	1
T3	27	4
T4	33	4
T5	33	2
T6	15	1
T7	24	2
T8	20	3
T9	32	3
T10	23	1
T11	27	3
T12	20	3
T13	19	2
T14	17	1
T15	20	2
PT16	17	1
PT17	20	3
PT18	32	1
PT19	38	2
PT20	29	2
PT21	20	2
PT22	18	1
PT23	29	3
PT24	25	1
PT25	31	3
PT26	16	1
PT27	37	14
PT28	31	7
PT29	31	2
PT30	21	1

a= idade em anos

6.1.5 Termo de Consentimento e Entrevistas com as mães doadoras

O desenvolvimento da pesquisa seguiu as normas internas do Berçário do Instituto da Criança. Todas as mães foram informadas a respeito da pesquisa com relação a sua finalidade, objetivos e metodologia. Foi também esclarecido a garantia

da privacidade dos dados e informações obtidas. Antes da coleta e após a explicação do projeto, as mães que aceitaram doar o leite responderam a um questionário (Anexo 2) e assinaram o termo de consentimento (Anexo 3), autorizando a coleta das amostras de leite materno.

6.1.6 Coleta das amostras

As amostras do colostro foram coletadas manualmente no período de 0 ao 5º dia pós-parto de 15 voluntárias de recém-nascidos pré-termo (≤ 36 e 6/7 semanas) e 15 amostras de leite materno termo (≥ 37 semanas), nos meses de abril a setembro de 2008. O volume coletado foi de aproximadamente 5 a 10 ml por doadora e o horário da coleta foi entre 10:00 às 12:00 horas, sempre após a amamentação dos recém-nascidos.

As amostras foram coletadas por profissionais da área da saúde nos leitos do HES e foram acondicionadas diretamente em recipientes de polietileno previamente limpos com água deionizada e com solução de 10% de HNO_3 p.a (Figura 6.2). Após a coleta, as amostras foram codificadas e pesadas.

FIGURA 6.2 – Coleta de amostras de leite materno

6.1.7 Transporte das amostras

Após a coleta, os recipientes foram colocados em caixas isotérmicas, contendo "gelo reciclável" em quantidade suficiente para manter os frascos de leite materno ordenhado em temperatura baixa (Figura 6.3).

FIGURA 6.3 – Armazenagem para o transporte das amostras de leite materno

Ao manter o leite a baixas temperaturas, evita-se a proliferação de microrganismos, resultando em um produto de melhor qualidade para análise.

Esses cuidados são necessários para assegurar que o produto transportado mantenha a mesma qualidade desde a coleta da doadora até a análise dos elementos essenciais.

6.1.8 Tratamento das amostras de leite materno

As amostras foram preparadas no laboratório de Análise por Ativação Neutrônica do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (LAN – IPEN). Logo após a chegada das amostras ao laboratório, as mesmas foram pipetadas com volume conhecidos e pesadas em recipiente de polietileno para calcular a média da densidade do leite. O cálculo da média da densidade do leite materno é bastante

importante, pois, o método de INAA requer as amostras na forma sólida (liofilizadas). Entretanto, para comparar com os dados da literatura, a mesma deve ser convertida para a forma *in natura*.

Após a transferência das amostras para os recipientes, as mesmas foram congeladas por no mínimo 12 horas. Após o congelamento, as amostras foram liofilizadas por aproximadamente 8 horas a pressão de até 49 μ bar no liofilizador Modulyo - Thermo electron Corporation - Modelo D-115 (Figura 6.4).

O método de liofilização é importante nessa etapa do processo, pois evita-se a ocorrência de reações de radiólise da água durante a irradiação. As amostras foram, então, pesadas novamente para verificar a porcentagem de umidade perdida na liofilização. A perda de água durante o processo de liofilização das amostras de leite foi em média de 86%. As mesmas foram homogeneizadas e armazenadas a 4°C para manter as condições ideais de análise.

É importante ressaltar que não foi determinado o teor residual de umidade das amostras de leite materno, pois o volume coletado para tal procedimento seria insuficiente, uma vez que após a amostra passar por esse processo deve ser descartada.

FIGURA 6.4 – Equipamento utilizado para liofilizar as amostras de leite materno

6.2 Fórmulas infantis

6.2.1 Aquisição das fórmulas infantis

Foi adquirido no comércio da cidade de São Paulo um total de 17 amostras de vários fabricantes das principais fórmulas infantis de nutrientes para recém-nascidos de alto risco; fórmula infantil para lactente; fórmula infantil para necessidades dietoterápicas específicas e fórmula infantil de seguimento para lactentes. Todas as amostras adquiridas estavam acondicionadas em latas de alumínio rotuladas de acordo com o fabricante, na forma de pó.

6.2.2 Preparação das amostras

Todas as amostras adquiridas em lata de alumínio na forma de pó foram codificadas (Tabela 6.2) e removidas para recipientes de polietileno, previamente limpos com água deionizada e com solução de 10% de HNO₃ PA. As amostras foram armazenadas em um refrigerador a 4°C na sala de freezer do Laboratório de Análise por Ativação (LAN), para posteriores análises. Na Figura 6.5 pode-se visualizar a seqüência simplificada da preparação das amostras para armazenagem.

Após a remoção da quantidade ideal das fórmulas infantis para os recipientes, o excesso contido na lata foi encaminhado para recém-nascidos voluntários que tinham indicação de uso das fórmulas de cada amostra. Essa preocupação foi mantida para todas as amostras, pois as fórmulas infantis são de alto custo e o método requer quantidades pequenas, portanto evitou-se o desperdício.

FIGURA 6.5 – Seqüência da preparação das amostras para armazenagem

6.2.3 Teor de umidade residual

Para que os resultados obtidos para as fórmulas infantis sejam dados em base seca, foi necessário verificar o teor de umidade residual.

A determinação da umidade foi feita utilizando o analisador de umidade MB45 da OHAUS Corporation, E.U.A. Cerca de 1 g de cada amostra foi aquecida a 85° C, até o peso constante. As percentagens de umidade obtidas variaram de 1,54 a 2,93%. O equipamento utilizado para determinar a umidade está apresentado na Figura 6.6.

FIGURA 6.6 – Equipamento de determinação de umidade

TABELA 6.2 – Código e descrição das fórmulas infantis com dados da idade adequada para o consumo

<i>Código das amostras*</i>	<i>Descrição das fórmulas infantis</i>	<i>Idade adequada</i>
FI – 1	Fórmula infantil para lactente - à base de leite	0 a 6 meses
FI – 2	Fórmula infantil de seguimento para lactentes - à base de leite	A partir dos 6 meses
FI – 3	Fórmula à base de proteína isolada de soja	Sem identificação de idade
FI – 4	Fórmula à base de proteína isolada de soja	Sem identificação de idade
FI – 5	Fórmula infantil de seguimento para lactentes - à base de leite	A partir dos 6 meses
FI – 6	Fórmula infantil para lactente - à base de leite	0 a 6 meses
FI – 7	Fórmula infantil de seguimento para lactentes - à base de leite	A partir dos 6 meses
FI – 8	Fórmula infantil para lactente - à base de leite	0 a 6 meses
FI – 9	Fórmula infantil de seguimento para lactentes - à base de leite	A partir dos 6 meses
FI – 10	Fórmula à base de leite	0-12 meses
FI – 11	Fórmula infantil para necessidades dietoterápicas específicas	Sem identificação de idade
FI – 12	Fórmula infantil para necessidades dietoterápicas específicas	Sem identificação de idade
FI – 13	Fórmula infantil para necessidades dietoterápicas específicas	Sem identificação de idade
FI – 14	Fórmula infantil para lactente - à base de leite	0 a 6 meses
FI – 15	Fórmula à base de proteína isolada de soja	Sem identificação de idade
FI – 16	Fórmula de nutrientes para recém-nascidos de alto risco	Menor de um ano de idade
FI – 17	Fórmula de nutrientes para recém-nascidos de alto risco	Menor de um ano de idade

* cada código representa uma amostra de marca diferente

6.3 Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental- INAA

Os elementos Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn foram determinados pela INAA nas amostras de leite materno colostro e em amostras de fórmulas infantis.

A Figura 6.7 mostra o fluxograma das principais etapas realizadas para determinação desses elementos.

FIGURA 6.7 – Principais etapas para análise por INAA

6.3.1. Preparação dos padrões sintéticos

O método de INAA requer a preparação de padrão, afim de que se possam comparar as atividades medidas da amostra com as do padrão.

Os padrões sintéticos dos elementos de interesse foram preparados a partir de soluções padrão da marca SPEX CERTI PREP USA. Concentrações

conhecidas das soluções padrão (cerca de $0,0246 \pm 0,0002 \mu\text{L}$ a $0,0990 \pm 0,0002 \mu\text{L}$) foram pipetadas sobre tiras de papel de filtro Whatman 40 e secadas sob temperatura ambiente ou sob lâmpada de infravermelho. Quando secas, essas tiras foram acondicionadas e devidamente seladas em recipientes de polietileno desmineralizado.

Para os elementos Mn e Se foi necessário a diluição das soluções originais antes de pipetar nas tiras de papel de filtro.

A solução original de Mn foi diluída em balão volumétrico de ($10,001 \pm 0,007 \text{ mL}$), onde foram pipetados ($0,0246 \pm 0,0002 \mu\text{L}$) da solução no papel de filtro. Essa solução foi preparada em meio aquoso.

Para o padrão de Se a solução original também foi diluída em balão volumétrico de ($10,0011 \pm 0,0071 \text{ mL}$), onde foi pipetados ($0,0246 \pm 0,0002 \mu\text{L}$) da solução no papel de filtro, essa solução também foi preparada em meio aquoso.

A Tabela 6.2 apresenta as concentrações das soluções padrão e as massas dos elementos irradiados.

TABELA 6.2 – Concentrações dos padrões e as massas irradiadas

<i>Elemento</i>	<i>Solução padrão Spex (mg L^{-1})</i>	<i>Massa do elemento irradiada (μg)</i>
Ca	10037 $\pm$ 30	990
Cl	10000 $\pm$ 30	246
Fe	10032 $\pm$ 30	494
K	10016 $\pm$ 30	991,5
Mg	9989 $\pm$ 30	991,1
Mn	1004 $\pm$ 3	4,9
Na	9982 $\pm$ 30	245
Se	10009 $\pm$ 30	0,241
Zn	1000 $\pm$ 3	24,5

6.3.2 Preparação e irradiação para determinação de radionuclídeos de meia-vida curtas (< 15 horas)

6.3.2.1 Leite materno

Cerca de 170 mg das amostras de leite materno liofilizadas foram pesadas na balança analítica (Modelo: Shimadzu – Libror AEL – 40SM) em invólucros de polietileno previamente desmineralizados com água deionizada e com solução a 10% de HNO₃ p.a. Após pesadas, as amostras de leite materno foram acondicionadas em dispositivos de plástico juntamente com os padrões de Cl, K, Mg, Mn e Na. As amostras e os padrões foram irradiados por 15 segundos num dispositivo pneumático do reator nuclear IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP, em fluxo de nêutrons da ordem $5 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

6.3.3 Preparação e irradiação para a determinação de radionuclídeos de meia-vida longa (de dias a anos)

6.3.3.1 Leite Materno

Cerca de 170 mg das amostras de leite materno liofilizadas em duplicatas foram pesadas na balança analítica (Modelo: Shimadzu – Libror AEL – 40SM) em recipientes de polietileno previamente desmineralizados com água deionizada e com solução a 10% de HNO₃ p.a. Após pesagem, as amostras de leite materno foram acondicionadas em dispositivos de alumínio juntamente com os padrões de Ca, Fe, Se e Zn. As amostras e os padrões foram irradiados por 8 horas no reator nuclear IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP, sob fluxo de nêutrons térmicos da ordem $5 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

6.3.3.2- Fórmula Infantil

Cerca de 200 mg das amostras de fórmula infantil em triplicatas foram pesadas na balança analítica (Modelo: Shimadzu – Libror AEL – 40SM) em recipientes de polietileno previamente desmineralizados com água deionizada e com solução a 10% de HNO₃ p.a. Após pesagem, as amostras de fórmula infantil foram acondicionadas em dispositivos de alumínio juntamente com os padrões pipetados de Ca, Fe, K, Na, Se e Zn. As amostras e os padrões foram irradiados por 8 horas no reator nuclear IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP, sob fluxo de nêutrons da ordem $5 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

6.3.4 Período de Decaimento

Ao término da irradiação curta, o dispositivo de plástico foi aberto e iniciaram-se as medidas das atividades induzidas no espectrômetro de raios gama para os seguintes radionuclídeos: ³⁸Cl e ²⁷Mg, pois os mesmos possuem tempo de meia-vida muito curta de 37,24 minutos e 9,46 minutos, respectivamente. Para os radionuclídeos ⁴²K, ⁵⁶Mn e ²⁴Na o tempo de decaimento decorrido para medir as atividades induzidas foi de 4200 segundos.

Para a irradiação longa que compreendeu o período de 8 horas, o dispositivo de alumínio contendo as amostras, padrões e materiais de referência certificados passaram por um período de decaimento de 5 a 15 dias em blindagem de chumbo.

6.3.5. Medidas das atividades induzidas

Após os períodos de decaimentos descritos acima, as medidas das atividades induzidas pelos radioisótopos produzidos nas amostras e nos padrões foram feitas de acordo com o tempo de meia-vida em espectrômetros de raios gama.

6.3.5.1 Medidas das atividades induzidas após “irradiação curta”

Para as irradiações curta o período de medida das atividades dos padrões de Cl e Mg foram de 300 segundos e para as amostras e materiais de referência foi de 600 segundos. Na segunda medição, após 4200 segundos de decaimento, os padrões de K, Mn e Na foram medidos por 1800 segundos e as amostras e materiais de referência por 3600 segundos.

6.3.5.2 Medidas das atividades induzidas após “irradiação longa”

O período de medida das atividades das irradiações longa é de 1800 segundos para cada padrão e 3600 segundos para cada amostra e material de referência. Nessa primeira medição foram determinados os teores dos elementos Ca, K e Na. Com um decaimento de 15 dias após a irradiação (tempo necessário para o decaimento de radionuclídeos de meias-vida mais curta, como o Na, que interferem nas determinações de outros elementos) amostras, padrões e materiais de referência certificados foram medidos novamente por um período de 3600 segundos para cada padrão e 60000 segundos para cada amostra e material de referência certificado. Essa segunda medição nos forneceu os teores de Fe, Se e Zn.

6.3.6 Espectrômetros utilizados

Para as determinações dos elementos foi utilizado um espectrômetro de raios gama constituído de um detector de germânio hiperpuro, da EG&G ORTEC modelo POP TOP HpGe, com 20% de eficiência e resolução de 1,9 keV para o pico 1332,49 keV do ^{60}Co , acoplados a analisadores multicanais e eletrônica associada e a microcomputadores para aquisição e processamentos dos dados. A Figura 6.8 ilustra um dos equipamentos utilizados para as medidas das atividades.

FIGURA 6.8 – Detector Canberra GX 2020 e em evidência o espectro com as energias e as respectivas contagens dos radionuclídeos

6.3.7 Identificação dos radionuclídeos

Para a análise dos espectros, foi utilizado o programa de computação VISPECT2 (PICCOT, 1989), que fornece as energias da radiação gama dos radionuclídeos de interesse e as respectivas áreas dos picos.

Por fim, as concentrações dos elementos foram calculadas usando-se o programa ESPECTRO, seguindo a expressão (17), já apresentada no item 5.1.

A Tabela 6.3 apresenta os dados nucleares dos radionuclídeos utilizados neste estudo, ^{47}Ca , ^{38}Cl , ^{59}Fe , ^{42}K , ^{27}Mg , ^{56}Mn , ^{24}Na , ^{75}Se , ^{65}Zn .

TABELA 6.3 – Características nucleares dos radionuclídeos determinados pela INAA

<i>Radionuclídeo</i>	<i>Tempo de meia-vida</i>	<i>Energia (keV)</i>
^{47}Ca	4,54 dias	1297,09
^{38}Cl	37,24 minutos	1642,69
^{59}Fe	44,5 dias	1099,25
^{42}K	12,36 horas	1524,58
^{27}Mg	9,46 minutos	843,76
^{56}Mn	2,58 horas	846,76
^{24}Na	14,96 horas	1368,60
^{75}Se	119,77 dias	264,66
^{65}Zn	243,9 dias	1115,55

CAPÍTULO 7

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Avaliação da precisão e exatidão da metodologia de INAA

A exatidão e a precisão da metodologia foram verificadas por meio de análise dos materiais de referência certificados da National Institute of Standards & Technology (NIST) Non-Fat Milk Powder SRM 1549 (NIST, 1985) e Whole Milk Powder RM – 8435 (NIST, 1999). Os resultados foram avaliados pelos parâmetros de desvio padrão relativo, erro relativo e pelos valores de Z score.

O cálculo do Z score leva em consideração o desvio padrão do valor certificado do material de referência e permite avaliar o desempenho do método analítico durante todo o processo, sendo bastante empregado no gerenciamento de sistemas de qualidade (BODE & DIJK, 1997).

Nas Tabelas 7.1 e 7.2 são apresentados os valores de concentração dos elementos determinados nos materiais de referência certificados.

TABELA 7.1 – Concentração dos elementos determinados no material de referência NIST-SRM 1549

Non Fat Milk Powder (NIST-SRM 1549)					
Elemento	Nesse trabalho ^a	DP rel %	ER%	Z score	Valor certificado
Ca mg g ⁻¹	12222 ± 686	6	6	- 1,5	13000 ± 500
Fe µg g ⁻¹	1,8 ± 0,1	6	1	0,2	1,78 ± 0,1
K mg g ⁻¹	16699 ± 1653	10	1	-0,67	16900 ± 300
Na mg g ⁻¹	4943 ± 510	10	1	-0,27	4970 ± 100
Se ng g ⁻¹	130 ± 2	2	18	2	110 ± 10
Zn µg g ⁻¹	42 ± 6	14	9	-1,9	46,1 ± 2,2

a= média ± desvio-padrão de oito determinações; DP rel= desvio padrão relativo; ER= erro relativo

TABELA 7.2 – Concentração dos elementos determinados no material de referência NIST-RM 8435

Whole Milk Powder (NIST-RM-8435)					
Elemento	Nesse trabalho ^b	DP rel %	ER%	Z score	Valor certificado
Ca mg g ⁻¹	9120 ± 340	4	1	-0,20	9220 ± 490
Cl mg g ^{-1c}	8588 ± 236	3	2	0,38	8420 ± 440
Fe µg g ⁻¹	2,0 ± 0,1	5	11	0,18	1,8 ± 1,1
K mg g ^{-1c}	14358 ± 449	3	5	1,54	13630 ± 470
Mg mg g ^{-1c}	757 ± 73	10	8	-0,75	814 ± 76
Mn mg g ^{-1c}	0,18 ± 0,01	6	6	0,2	0,17 ± 0,05
Na mg g ^{-1c}	3519 ± 184	5	1	-0,10	3560 ± 400
Se ng g ⁻¹	135 ± 13	10	3	0,28	131 ± 14
Zn µg g ⁻¹	27 ± 2	7	4	-0,32	28,0 ± 3,1

b= média ± desvio-padrão de seis determinações; c= média ± desvio-padrão de três determinações; DP rel= desvio padrão relativo; ER= erro relativo

Os valores obtidos de $|Z| \leq 2$ indicam que os resultados são considerados satisfatórios em 95% nível de confiança (THOMPSON & WOOD, 1993). Os resultados do desvio padrão relativo (DP rel) e o erro relativo (ER) para

a maioria dos elementos foram inferiores a 10% indicando que os dados obtidos apresentam boa precisão e exatidão.

7.2 Determinação dos limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados de acordo com a definição da IUPAC (União internacional de química pura e aplicada) (CURRIE, 1995). Para o cálculo do limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) pela técnica de INAA foram utilizadas seguintes expressões:

$$LD = \frac{3 \sqrt{BG}}{LT} \quad (7.1)$$

$$LQ = \frac{10 \sqrt{BG}}{LT} \quad (7.2)$$

Onde,

BG = radiação de fundo

LT = tempo de contagem (tempo vivo)

O valor da radiação de fundo (BG) foi obtido diretamente de dados emitidos (espectros) no programa VISPECT 2, para as energias dos elementos de interesse.

O valor de LD expresso pela equação 7.1 representa a taxa de contagem correspondente à massa mínima detectável pela técnica de INAA. Utilizando-se o valor de LD obtido para a amostra e padrão e considerando o tempo de contagem (LT), calculou-se a concentração mínima detectável.

Relacionando-se os valores de LQ para a amostra e padrão e considerando o tempo de contagem, calculou-se o limite de quantificação para cada elemento.

Para a determinação dos LD e LQ para os elementos de interesse seguiram as condições estabelecidas no item 6.3.4 do capítulo 6.

Na Tabela 7.3 são apresentados os limites de detecção e quantificação obtidos para as amostras de leite materno e para as fórmulas infantis pela técnica de INAA.

Tabela 7.3 - Limites de detecção e quantificação determinados em amostras de leite materno e fórmulas infantis pela técnica INAA

Elemento	Energia dos raios gama (keV)	Leite materno		Fórmula infantil	
		LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)*	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)**	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)*	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)**
Ca	159,38	95	317	291	970
Cl	1642,69	36	120	ND	ND
Fe	1099,25	1,0	3,3	0,95	3,2
K	1524,58	66	222	16	53
Mg	843,76	72	239	ND	ND
Mn	846,76	0,003	0,011	ND	ND
Na	1368,60	0,93	3,10	3,2	10,6
Se	264,66	0,003	0,011	0,003	0,01
Zn	1115,55	0,13	0,42	0,05	0,16

ND não determinado; *LD limite de detecção; **LQ Limite de quantificação

7.3 Análise das amostras de leite materno por INAA

Os resultados dos elementos determinados por INAA no leite materno colostro de mães de recém-nascidos pré-termo e a termo foram obtidos em $\mu\text{g g}^{-1}$ e para comparar os dados obtidos com a literatura os resultados foram convertidos em mg L^{-1} (*in natura*), levando-se em consideração a média da

densidade do leite materno ($0,95005 \text{ g mL}^{-1}$) e o fator de umidade das amostras liofilizadas ($\text{massa}_{\text{úmida}} - \text{massa}_{\text{liofilizada}}$). Nas Tabelas 7.3a, 7.3b, 7.4a e 7.4b são apresentados, respectivamente, as médias de 2 determinações e os desvios-padrão das concentrações dos elementos maiores e dos elementos traço do leite colostro e a média do grupo e o desvio-padrão, mínimo e máximo. São apresentados resultados de 15 amostras de recém-nascidos termo e 15 de pré-termo.

TABELA 7.3 a – Concentrações dos elementos maiores (Ca, Cl, K, Mg e Na) no leite materno a termo

Amostras	Elementos																													
	Ca*				Cl*				K*				Mg*				Na*													
	µg g ⁻¹		mg L ⁻¹		µg g ⁻¹		mg L ⁻¹		µg g ⁻¹		mg L ⁻¹		µg g ⁻¹		mg L ⁻¹		µg g ⁻¹		mg L ⁻¹											
T1	1695	±	134	205	±	16	4693	±	179	567	±	22	5899	±	218	713	±	26	148	±	23	17,9	±	2,8	2358	±	98	285	±	12
T2	2333	±	50	325	±	7	5432	±	511	756	±	71	6741	±	130	938	±	18	62	±	2	8,6	±	0,3	3237	±	42	451	±	6
T3	1742	±	195	259	±	29	4751	±	530	707	±	79	4494	±	141	669	±	21	98	±	2	14,6	±	0,3	2852	±	65	425	±	10
T4	1616	±	19	230	±	3	6004	±	586	855	±	83	5507	±	162	785	±	23	163	±	28	23,2	±	4,0	3677	±	23	524	±	3
T5	2599	±	230	307	±	27	4756	±	87	562	±	10	6434	±	552	760	±	65	129	±	15	15,2	±	1,8	2629	±	74	311	±	9
T6	1469	±	142	213	±	21	8498	±	189	1231	±	27	4217	±	129	611	±	19	261	±	24	37,8	±	3,5	5821	±	745	844	±	108
T7	1796	±	130	247	±	18	4004	±	420	552	±	58	5609	±	387	773	±	53	122	±	18	16,8	±	2,5	1723	±	134	237	±	18
T8	1322	±	10	180	±	1	4184	±	170	571	±	23	5716	±	243	780	±	33	129	±	14	17,6	±	1,9	1867	±	8	255	±	1
T9	1875	±	124	227	±	15	6001	±	100	727	±	12	6067	±	685	735	±	83	152	±	25	18,4	±	3,0	3481	±	5	422	±	1
T10	1524	±	64	216	±	9	7651	±	110	1086	±	16	3710	±	66	526	±	9	168	±	25	23,8	±	3,6	7747	±	153	1099	±	22
T11	2008	±	104	211	±	11	9287	±	531	975	±	56	5520	±	298	580	±	31	85	±	12	8,9	±	1,3	4582	±	52	481	±	5
T12	1427	±	23	205	±	3	5719	±	525	822	±	76	4812	±	289	692	±	42	165	±	22	23,7	±	3,2	2742	±	87	394	±	13
T13	1642	±	93	184	±	10	8608	±	123	965	±	14	3751	±	460	421	±	52	122	±	12	13,7	±	1,4	7759	±	176	870	±	20
T14	1176	±	165	156	±	22	10625	±	1354	1409	±	180	3028	±	427	402	±	57	44	±	4	5,8	±	0,5	8695	±	64	1153	±	8
T15	2794	±	107	489	±	19	6444	±	210	1129	±	37	2201	±	195	385	±	34	87	±	11	15,2	±	1,9	9857	±	168	1726	±	29
M ± DP**	1801	±	461	244	±	81	6444	±	2030	861	±	266	4914	±	1314	651	±	161	129	±	53	17,4	±	7,8	4602	±	2685	632	±	424
Mínimo	1176			156			4004			552			2201			385			44			5,8			1723			237		
Máximo	2794			489			10625			1409			6741			938			261			37,8			9857			1726		

T= amostras de leite materno termo; * média ± desvio-padrão de 2 determinações; ** média ± desvio-padrão

TABELA 7.3 b – Concentrações dos elementos maiores (Ca, Cl, K, Mg e Na) no leite materno pré-termo

Amostras	Elementos													
	Ca*		Cl*		K*		Mg*		Na*					
	µg g ⁻¹	mg L ⁻¹	µg g ⁻¹	mg L ⁻¹	µg g ⁻¹	mg L ⁻¹	µg g ⁻¹	mg L ⁻¹	µg g ⁻¹	mg L ⁻¹	µg g ⁻¹	mg L ⁻¹	µg g ⁻¹	mg L ⁻¹
PT16	1302 ± 66	302 ± 15	3028 ± 80	701 ± 19	3833 ± 37	888 ± 9	128 ± 9	29,7 ± 2,1	2413 ± 16	559 ± 4				
PT17	1058 ± 88	154 ± 13	8197 ± 114	1189 ± 17	1994 ± 151	289 ± 22	142 ± 7	20,6 ± 1,0	12048 ± 130	1748 ± 19				
PT18	1043 ± 5	130 ± 1	8758 ± 472	1093 ± 59	5837 ± 472	729 ± 59	169 ± 28	21,1 ± 3,5	7182 ± 74	897 ± 9				
PT19	2561 ± 150	345 ± 20	4740 ± 348	638 ± 47	7300 ± 50	983 ± 7	165 ± 10	22,2 ± 1,4	2066 ± 69	278 ± 9				
PT20	1416 ± 7	181 ± 1	8355 ± 194	1070 ± 25	2935 ± 238	376 ± 30	33 ± 4	4,2 ± 0,5	5781 ± 168	740 ± 22				
PT21	1258 ± 52	218 ± 9	4396 ± 250	763 ± 43	4872 ± 516	846 ± 90	142 ± 20	24,7 ± 3,5	2897 ± 111	503 ± 19				
PT22	1413 ± 11	181 ± 1	7318 ± 11	937 ± 1	5432 ± 305	695 ± 39	84 ± 6	10,8 ± 0,8	3711 ± 57	475 ± 7				
PT23	1149 ± 45	281 ± 11	5665 ± 196	1388 ± 48	3837 ± 25	940 ± 6	216 ± 5	52,9 ± 1,2	4855 ± 67	1189 ± 16				
PT24	1189 ± 126	160 ± 17	5818 ± 828	782 ± 111	5332 ± 389	716 ± 52	199 ± 26	26,7 ± 3,5	3504 ± 64	471 ± 9				
PT25	1149 ± 44	257 ± 10	5418 ± 369	1211 ± 83	2759 ± 245	617 ± 55	279 ± 19	62,4 ± 4,2	4869 ± 669	1089 ± 150				
PT26	2226 ± 23	597 ± 6	3137 ± 136	842 ± 36	3247 ± 399	871 ± 107	242 ± 8	64,9 ± 2,1	2719 ± 64	730 ± 17				
PT27	1042 ± 52	176 ± 9	3737 ± 298	632 ± 50	5593 ± 153	946 ± 26	138 ± 24	23,3 ± 4,1	2387 ± 11	404 ± 2				
PT28	1779 ± 33	287 ± 5	4378 ± 421	706 ± 68	3557 ± 225	573 ± 36	98 ± 12	15,8 ± 1,9	6538 ± 306	1054 ± 49				
PT29	1219 ± 33	152 ± 4	5939 ± 1038	740 ± 129	7018 ± 1105	875 ± 138	207 ± 11	25,8 ± 1,4	3120 ± 68	389 ± 8				
PT30	1212 ± 78	237 ± 15	6421 ± 295	1253 ± 58	2068 ± 146	404 ± 28	127 ± 14	24,8 ± 2,7	7535 ± 84	1471 ± 16				
M ± DP**	1401 ± 448	244 ± 117	5687 ± 1849	930 ± 250	4374 ± 1683	717 ± 223	158 ± 64	28,7 ± 17,6	4775 ± 2703	800 ± 433				
Mínimo	1042	130	3028	632	1994	289	33	4,2	2066	278				
Máximo	2561	597	8758	1388	7300	983	279	64,9	12048	1748				

PT= amostras de leite materno pré-termo; * média ± desvio-padrão de 2 determinações; ** média ± desvio-padrão

TABELA 7.4 a – Concentrações dos elementos traço (Fe, Mn, Se e Zn) no leite materno a termo

Amostras	Elementos											
	Fe				Mn				Se			
	$\mu\text{g g}^{-1}$		mg L^{-1}		$\mu\text{g g}^{-1}$		mg L^{-1}		$\mu\text{g g}^{-1}$		mg L^{-1}	
T1	2,6	± 0,2	0,314	± 0,024	ND		ND		121	± 8	14,6	± 1,0
T2	3,7	± 0,6	0,515	± 0,084	ND		ND		121	± 12	16,8	± 1,7
T3	3,3	± 0,3	0,491	± 0,045	0,15	± 0,02	0,022	± 0,003	90	± 2	13,4	± 0,3
T4	2,8	± 0,4	0,399	± 0,057	0,46	± 0,03	0,066	± 0,004	134	± 6	19,1	± 0,9
T5	4,4	± 0,5	0,520	± 0,059	0,10	± 0,01	0,012	± 0,001	126	± 9	14,9	± 1,1
T6	4,2	± 0,5	0,609	± 0,072	0,25	± 0,04	0,036	± 0,006	171	± 26	24,8	± 3,8
T7	3,4	± 0,9	0,468	± 0,124	ND		ND		61	± 2	8,4	± 0,3
T8	3,7	± 0,4	0,505	± 0,055	0,34	± 0,03	0,046	± 0,004	125	± 12	17,1	± 1,6
T9	4,1	± 1,0	0,497	± 0,121	0,30	± 0,03	0,036	± 0,004	125	± 10	15,2	± 1,2
T10	3,4	± 0,7	0,482	± 0,099	ND		ND		211	± 4	29,9	± 0,6
T11	1,8	± 0,5	0,189	± 0,052	0,05	± 0,02	0,005	± 0,002	76	± 3	8,0	± 0,3
T12	2,9	± 0,5	0,417	± 0,072	ND		ND		141	± 17	20,3	± 2,4
T13	1,2	± 0,1	0,135	± 0,011	ND		ND		144	± 21	16,1	± 2,4
T14	4,0	± 0,6	0,530	± 0,080	0,12	± 0,07	0,016	± 0,009	189	± 4	25,1	± 0,5
T15	9,8	± 0,1	1,716	± 0,018	ND		ND		230	± 13	40,3	± 2,3
M ± DP**	37	± 1,9	0,519	± 0,356	0,22	± 0,14	0,03	± 0,02	138	± 47	18,9	± 8,4
Mínimo	1,2		0,135		0,05		0,01		61		8,0	
Máximo	9,8		1,716		0,46		0,07		230		40,3	

T= amostras de leite materno termo; * média ± desvio-padrão de 2 determinações; ND= não detectado; ** média ± desvio-padrão

TABELA 7.4 b – Concentrações dos elementos traço (Fe, Mn, Se e Zn) no leite materno pré-termo

Amostras	Elementos											
	Fe			Mn			Se			Zn		
	$\mu\text{g g}^{-1}$	mg L^{-1}		$\mu\text{g g}^{-1}$	mg L^{-1}		$\mu\text{g g}^{-1}$	mg L^{-1}		$\mu\text{g g}^{-1}$	mg L^{-1}	
PT16	4,0 ± 0,2	0,927 ± 0,046		ND	ND		251 ± 10	58,1 ± 2,3		141 ± 4	32,7 ± 0,9	
PT17	2,3 ± 0,1	0,334 ± 0,015		ND	ND		367 ± 2	53,3 ± 0,3		63 ± 5	9,1 ± 0,7	
PT18	1,2 ± 0,1	0,150 ± 0,012		ND	ND		204 ± 14	25,5 ± 1,7		35 ± 1	4,4 ± 0,1	
PT19	3,7 ± 0,4	0,498 ± 0,054	0,03 ± 0,01	0,004 ± 0,001			103 ± 4	13,9 ± 0,5		34 ± 1	4,6 ± 0,1	
PT20	6,2 ± 0,1	0,794 ± 0,013	0,70 ± 0,20	0,090 ± 0,026			147 ± 4	18,8 ± 0,5		102 ± 1	13,1 ± 0,1	
PT21	3,1 ± 0,4	0,538 ± 0,069		ND	ND		230 ± 26	39,9 ± 4,5		65 ± 4	11,3 ± 0,7	
PT22	4,6 ± 0,7	0,589 ± 0,090	0,10 ± 0,01	0,013 ± 0,001			111 ± 1	14,2 ± 0,1		93 ± 6	11,9 ± 0,8	
PT23	7,4 ± 0,2	1,813 ± 0,049		ND	ND		346 ± 2	84,8 ± 0,5		26 ± 1	6,4 ± 0,2	
PT24	3,6 ± 0,8	0,484 ± 0,107		ND	ND		76 ± 2	10,2 ± 0,3		34 ± 1	4,6 ± 0,1	
PT25	4,3 ± 0,6	0,961 ± 0,134		ND	ND		174 ± 4	38,9 ± 0,9		27 ± 1	6,0 ± 0,2	
PT26	4,9 ± 1,0	1,315 ± 0,268	0,09 ± 0,02	0,024 ± 0,005			134 ± 2	36,0 ± 0,5		22 ± 3	5,9 ± 0,8	
PT27	3,6 ± 0,6	0,609 ± 0,102		ND	ND		80 ± 1	13,5 ± 0,2		71 ± 1	12,0 ± 0,2	
PT28	5,0 ± 1,0	0,806 ± 0,161		ND	ND		203 ± 3	32,7 ± 0,5		83 ± 1	13,4 ± 0,2	
PT29	4,3 ± 0,3	0,536 ± 0,037		ND	ND		60 ± 8	7,5 ± 1,0		44 ± 1	5,5 ± 0,1	
PT30	5,2 ± 0,2	1,015 ± 0,039		ND	ND		53 ± 1	10,3 ± 0,2		50 ± 4	9,8 ± 0,8	
M ± DP**	4,2 ± 1,5	0,758 ± 0,414	0,23 ± 0,31	0,03 ± 0,04			169 ± 98	30,5 ± 22,0		59 ± 34	10,1 ± 7,1	
Mínimo	1,2	0,150	0,03	0,004			53	7,5		22	4,4	
Máximo	7,4	1,813	0,70	0,09			367	84,8		141	32,7	

PT= amostras de leite materno pré-termo; * média ± desvio-padrão de 2 determinações; ND= não detectado; ** média ± desvio-padrão

Akanle et al (2000) analisaram 16 amostras de leite materno pré-termo e 20 amostras de termo coletadas na primeira semana de lactação de mães nigerianas. As técnicas utilizadas foram INAA e PIXE (emissão de raios X induzida por prótons). O resultado do estudo sugere que o leite das mães dos recém-nascidos prematuros pode fornecer quantidade suficiente de minerais na primeira semana de vida do lactente. Na Tabela 7.5 são apresentados os resultados obtidos por Akanle et al e os valores médios obtidos neste trabalho.

TABELA 7.5 – Concentrações dos elementos das amostras de leite colostro e comparação com a literatura ($\mu\text{g g}^{-1}$)

<i>Elementos</i>	<i>Nesse estudo</i>	<i>Akanle et al, 2000</i>	<i>Nesse estudo</i>	<i>Akanle et al, 2000</i>
	<i>Pré-termo</i>	<i>Pré-termo</i>	<i>Termo</i>	<i>Termo</i>
	<i>Média ± desvio-padrão</i>	<i>Média ± desvio-padrão</i>	<i>Média ± desvio-padrão</i>	<i>Média ± desvio-padrão</i>
Ca	1400 ± 53	2655 ± 520	1801 ± 106	2860 ± 640
Cl	6307 ± 208	4620 ± 560	6444 ± 375	4020 ± 550
Fe	4,1 ± 0,3	11,1 ± 2,1	3,7 ± 0,5	9,3 ± 15,5
K	4505 ± 224	4330 ± 520	4914 ± 292	3810 ± 420
Mg	135 ± 11	320 ± 36	129 ± 16	287 ± 25
Mn	0,28 ± 0,07	0,39 ± 0,17	0,22 ± 0,03	0,24 ± 0,11
Na	5119 ± 87	3090 ± 420	4602 ± 126	2740 ± 260
Se	220 ± 8	ND	138 ± 10	ND
Zn	70 ± 3	31,4 ± 6,3	61 ± 1	25,8 ± 5,8

ND = não detectado

Na Tabela 7.6 encontra-se a média das concentrações de elementos de leite materno obtidas na literatura e a faixa de variação do presente estudo para o colostro de recém-nascidos pré-termo e a termo.

TABELA 7.6 – Comparação dos resultados do colostro com a literatura (mg L⁻¹)

Países	C*	Ca	Cl	Fe	K	Mg	Mn**	Na	Se**	Zn
Nesse trabalho	PT	130-597	632-1388	0,15-1,8	289-983	4,2-64,9	4,0-9,0	278-1748	7,5-84,8	4,4-32,7
	T	156-489	552-1409	0,14-1,7	385-938	5,8-37,8	5,0-6,6	237-1726	8,0-40,3	4,8-12,6
Bélgica (Benemariya et al., 1995)	T	-	-	-	-	-	-	-	15,2	3,76
Portugal (Almeida et al., 2008)	T	-	--	--	--	--	2,2-27,5	--	34,2-188	1,9-22,0
	PT	-	-	0,54-3,28		-	-	-	-	1,54-13,25
Brasil (Costa et al., 2003)	T			0,24-3,76						2,41-14,49
Japão (Yamawaki et al., 2005)	T	293	341	1,1	723	35	0,012	327	25	4,75
WHO (1973)		250-300	-	0,4-0,8	-	-	-	-	-	4 – 5

*C colostro; PT: pré-termo; T: termo; ** em µg L⁻¹

Na Tabela 7.6 nota-se que as comparações das concentrações obtidas nesse trabalho com alguns outros países mostram que os resultados foram concordantes e a faixa de variação obtida compreende os valores encontrados por diversos países.

7.3.1 Análise estatística – Leite materno

Os resultados obtidos no presente estudo foram avaliados por meio de análise de agrupamento ("*cluster analysis*"), análise discriminante, construção de *Box-plot*, teste de Mann-Whitney e o teste *t student*.

De acordo com a análise de agrupamento, as amostras foram organizadas com base em seu grau de similaridade, com objetivo de organizar informações sobre as variáveis e formar grupos homogêneos ("*to cluster*" = agrupar), como observado na Figura 7.1.

Para que essa técnica estatística multivariada fosse aplicada, primeiramente foi estabelecida a normalização dos dados obtidos em relação à unidade de medida. Após esse processo, para realizar o agrupamento, adotou-se a distância Euclidiana como medida de similaridade e os casos foram ligados entre si pelo método de Ward (BARROSO, 2003).

A partir da Figura 7.1 é possível identificar a formação de 2 grupos (G1 e G2) heterogêneos para as amostras de leite colostro pré-termo e a termo, dessa forma relaciona os casos mais semelhantes entre si, com relação às concentrações dos elementos independentes da idade gestacional.

Os casos incluídos no G1, encontram-se descritos o maior número de casos que apresentaram altas concentrações dos elementos Cl, Fe, Mg, Na e Zn,

exceto para o K que apresentou baixa concentração nesse grupo.

No G2, demonstram casos em que as concentrações são mais baixas para alguns elementos, por exemplo, Cl, Mg e o Na. Entretanto, esse grupo apresentou uma faixa de variação maior nas concentrações dos elementos quando comparados com o grupo 1.

De um modo geral, analisando a composição dos grupos, constatou-se que neles pode-se encontrar os dois períodos da idade gestacional, tratando de grupos heterogêneos com relação a idade gestacional.

Figura 7.1 – Dendrograma para agrupamento das amostras de leite materno colostro

Foi realizada também a análise discriminante dos resultados para validar a análise de agrupamento, baseando-se no método canônico. Na Figura 7.2, mostram-se os escores das funções discriminantes para as amostras de leite materno.

FIGURA 7.2 – Funções discriminantes para as amostras de leite materno

A partir da análise discriminante, verificou-se que as amostras foram classificadas corretamente em seus respectivos grupos, indicando que as amostras de leite materno pré-termo possuem características similares com as amostras de leite materno termo.

Para identificar as amostras discrepantes em cada grupo (pré-termo e termo) foram feitos *Box-Plot*, relacionando as concentrações dos elementos determinados com relação a idade gestacional. Estes grupos foram descritos através de suas idades e paridade. Para cada um dos componentes estudados e para cada grupo, foram calculadas as medianas, valores máximos e mínimos, tendo a comparação entre os grupos sido feita através do Teste de Mann-Whitney.

Em todas as análises foi adotado um nível de significância de 5%, tendo sido utilizado o software estatístico SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

As amostras discrepantes, também chamadas de amostras atípicas ou “*outlier*”, trata-se de dados que parecem ser divergentes em relação ao conjunto de dados remanescentes (BARNETT e LEWIS, 1995).

As distribuições das concentrações obtidas para Cálcio, Cloro e Potássio estão apresentadas nas Figuras 7.3, 7.4 e 7.5.

Figura 7.3 - Distribuição da concentração de Ca

Figura 7.4 - Distribuição da concentração de Cl

Figura 7.5 - Distribuição da concentração de K

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as medianas das concentrações de Cálcio, Cloro e Potássio dos 2 grupos, conforme Tabela 7.7:

Tabela 7.7 - Concentrações de Cálcio, Cloro e Potássio no colostro dos 2 grupos

<i>Variável / Grupo</i>	<i>Mediana</i>	<i>Valor Máximo</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Mann-Whitney (p)</i>
Ca / Parto a termo (n=15)	216,2	489,0	156,0	0,604
Ca / Parto prematuro (n=15)	218,4	597,0	130,0	
Cl / Parto a termo (n=15)	822,4	1409,0	552,0	0,468
Cl / Parto prematuro (n=15)	841,9	1388,0	632,0	
K / Parto a termo (n=15)	692,0	938,0	385,0	0,272
K / Parto prematuro (n=15)	728,7	983,0	289,0	

As distribuições das concentrações obtidas para Manganês, Sódio, Selênio e Zinco estão apresentadas nas Figuras 7.6, 7.7, 7.8 e 7.9.

Figura 7.6 - Distribuição da concentração de Mn

Figura 7.7 - Distribuição da concentração de Na

Figura 7.8 - Distribuição da concentração de Se

Figura 7.9 - Distribuição da concentração de Zn

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as medianas das concentrações de Manganês, Sódio, Selênio e Zinco dos 2 grupos, conforme Tabela 7.8:

Tabela 7.8 - Concentrações de Manganês, Sódio, Selênio e Zinco no colostro dos 2 grupos

<i>Variável / Grupo</i>	<i>Mediana</i>	<i>Valor Máximo</i>	<i>Valor Mínimo</i>	<i>Mann-Whitney (p)</i>
Mn / Parto a termo (n=8)	0,292	0,066	0,005	
Mn / Parto prematuro (n=4)	0,018	0,090	0,004	0,734
Na / Parto a termo (n=15)	450,6	1726,0	237,0	
Na / Parto prematuro (n=15)	729,7	1748,0	278,0	0,178
Se / Parto a termo (n=15)	16,8	40,3	8,0	
Se / Parto prematuro (n=15)	25,4	84,8	7,5	0,330
Zn / Parto a termo (n=15)	6,9	12,6	4,8	
Zn / Parto prematuro (n=15)	9,1	32,7	4,4	0,694

As distribuições das concentrações obtidas para Ferro e Magnésio estão apresentadas nas Figuras 7.10 e 7.11:

Figura 7.10 - Distribuição da concentração de Fe

Figura 7.11 - Distribuição da concentração de Mg

As diferenças encontradas entre as medianas das concentrações de Ferro e Magnésio dos 2 grupos resultaram estatisticamente significantes, conforme Tabela 7.9, a seguir:

Tabela 7.9 - Concentrações de Ferro e Magnésio no colostro dos 2 grupos

Variável / Grupo	Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo	Mann-Whitney (p)
Fe / Parto a termo (n=15)	0,49	1,71	0,13	0,014
Fe / Parto prematuro (n=15)	0,60	1,81	0,15	
Mg / Parto a termo (n=15)	16,8	37,8	5,8	0,017
Mg / Parto prematuro (n=15)	24,6	64,9	4,2	

Os elementos Fe, Mg, e Se apresentaram *outlier* para amostras de recém-nascidos pré-termo e a termo. Para o Ca apenas uma amostra de pré-termo apresentou valor discrepante e o Na apresentou valor discrepante para uma amostra de recém-nascido a termo. A amostra T15 apresentou *outliers* para os seguintes elementos Na e Se e apresentou também valores extremos para o Ca e o Fe. Essa amostra requer nova análise para possíveis diagnósticos. Esses pontos discrepantes não devem ser rejeitados, pois podem trazer informações passíveis de investigação, sugerindo possíveis erros de medição, assim como, variabilidade populacional do atributo medido, entre outros fatores. A identificação de valores discrepantes em amostras multivariadas é de extrema dificuldade, visto que a inspeção de cada variável isolada não é suficiente para identificar uma amostra discrepante (SANTOS, 2007a).

Yamawaki et al (2005) analisaram leite materno de 1 – 365 dias pós-parto

de 1190 mães, com idade abaixo de 40 anos de várias regiões do Japão. A concentração dos elementos determinados foi similar a concentração obtida nesse trabalho. Para os elementos estudados, nos primeiros cinco dias pós-parto apresentaram uma pequena variação em relação aos dias posteriores, portanto o leite colostro no seu período inicial apresenta uma tendência aumentada das concentrações dos elementos estudados em relação aos dias subseqüentes.

A Tabela 7.10 a seguir mostra as distribuições de idade e paridade nos 2 grupos, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as medianas.

Tabela 7.10 - Idade materna e paridade nos 2 grupos

Variável / Grupo	Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo	Mann-Whitney (p)
Idade / Parto a termo (n=15)	23	33	14	0,298
Idade/ Parto prematuro (n=15)	29	38	16	
Paridade / Parto a termo (n=15)	2	4	1	0,620
Paridade / Parto prematuro (n=15)	2	14	1	

Não foram encontradas correlações (Pearson) estatisticamente significantes entre as concentrações e os dias das coletas de material para todas as variáveis estudadas.

Pode-se verificar que o colostro do leite materno pré-termo é semelhante ao colostro do leite materno termo quanto ao conteúdo dos elementos pesquisados. Para verificar essa semelhança na concentração dos elementos entre os dois grupos analisados foi aplicado também o teste t *student*, para verificar a similaridade com as

médias dos dois grupos de idade gestacional. Na Tabela 7.11 podemos visualizar os valores obtidos do t (calculado) e do (t ajustado) para os dois grupos de idade gestacional em relação aos elementos de interesse.

Tabela 7.11 - Parâmetros utilizados na comparação das concentrações no leite materno pré-termo e a termo

Elemento	$n_1 ; n_2$	$t_{calculado}$	$t_{ajustado}$	Conclusão
Ca	15 ; 15	-0,004	2,048	*
Cl	15 ; 15	-0,729	2,048	*
Fe	15 ; 15	-1,693	2,048	*
K	15 ; 15	-0,918	2,048	*
Mg	15 ; 15	-2,255	2,048	**
Mn	4 ; 8	-0,161	2,228	*
Na	15 ; 15	-1,073	2,048	*
Se	15 ; 15	-1,908	2,048	*
Zn	15 ; 15	-1,042	2,048	*

n_1 = número de amostras de recém-nascidos pré-termo; n_2 = número de amostras de recém-nascidos a termo; * as médias podem ser consideradas iguais; ** as médias não podem ser consideradas iguais

Para as médias analisadas entre os dois grupos (pré-termo e a termo) apenas o elemento magnésio apresentou diferença nas médias entre os dois grupos, essa diferença pode está relacionada com a oscilação na faixa de concentração desse elemento em ambos os grupos. Para todos os outros elementos (Ca, Cl, Fe, K, Mn, Na, Se e Zn) as médias podem ser consideradas iguais nos dois grupos.

7.4 Análise das fórmulas infantis comercializadas por INAA

As concentrações dos elementos nas fórmulas infantis por INAA foram obtidas em mg g^{-1} para o Ca, Fe, K, Na e Zn e $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Se. Porém, nesse trabalho as concentrações foram expressas em mg/kcal e em $\mu\text{g/kcal}$ para facilitar as comparações com a rotulagem assim como com as recomendações da ANVISA (BRASIL, 1998) e *Codex Alimentarius* (1981). Os resultados das fórmulas infantis comercializadas no Estado de São Paulo são apresentados nas Tabelas 7.12 e 7.13, assim como os valores declarados nos rótulos das embalagens e os valores recomendados pela ANVISA e da *Codex Alimentarius*.

Os resultados dos elementos determinados representam a média e o desvio padrão de 3 determinações individuais para cada amostra de fórmula infantil. A maioria das amostras das fórmulas analisadas neste estudo apresentaram resultados semelhantes com aqueles apresentados nos rótulos, exceto para algumas amostras que além da variação com a rotulagem também variaram em relação a faixa de tolerância estabelecida pela ANVISA de mais ou menos 20%.

Para o Ca, a ANVISA recomenda níveis de 50-90 mg de Ca/100kcal nas fórmulas infantis. Para a amostra FI-5 o valor variou 40% com relação aos valores do rótulo. Porém, o resultado está dentro da faixa de recomendação descrito pela ANVISA.

As concentrações de Fe nesse trabalho foram similares aos declarados pelo fabricante, todas as amostras estão com valores observados e dos rótulos dentro das recomendações da ANVISA, exceto a amostra (FI-13) que está abaixo. Em relação ao *Codex*, os teores de Fe para todas as amostras analisadas encontraram-se superiores aos recomendados.

Os resultados obtidos para o K mostram que para a maioria das amostras há uma boa concordância entre os dados obtidos e os valores declarados nos rótulos ou dentro da faixa recomendada pela ANVISA de 80-200 mg K/100kcal e pela *Codex* de 60-180 mg K/kcal. Para amostras FI-4, FI-6 e FI-10 foram obtidos concentrações de K diferentes daqueles declarados nos rótulos. Já para amostras FI-6 e FI-14 os valores de K encontrados foram inferiores aos recomendados pela ANVISA.

Algumas amostras apresentam diferença nas concentrações de Na com relação aos valores declarados pelos fabricantes, porém para todas as amostras os resultados estão dentro do intervalo recomendado pela ANVISA de 20-85 mg Na/100kcal.

A falta de informação da concentração de Se nos rótulos das fórmulas infantis pode ser um ponto negativo na manufatura das fórmulas infantis comercializadas na cidade de São Paulo. Segundo o *Codex*, a recomendação de selênio para as fórmulas infantis é de 1 µg/100kcal e segue um protocolo baseado nos riscos gerados a partir do nível superior de orientação clínica (GUL = guidance upper levels) que não pode ultrapassar 9 µg/100kcal. Seguindo essa orientação nenhuma amostra ultrapassou o GUL.

Para as concentrações de Zn os resultados são bastante satisfatórios, exceto para uma amostra (FI-15) que variou 55% com relação ao declarado no rótulo.

TABELA 7.12 – Concentrações dos elementos maiores obtidos nas fórmulas infantis e valores dos rótulos e as recomendações em mg/100kcal

Amostras	Ca mg/100 kcal				Na mg/100 kcal				K mg/100 kcal			
	ANVISA (50-90 mg Ca/100 kcal)				ANVISA (20-85 mg Na/100 kcal)				ANVISA (80-200 mg K/100 kcal)			
	Codex (50 mg Ca/100 kcal)				Codex (20-60 mg Na/100 kcal)				Codex (60-180 mg K/100 kcal)			
	Rótulo	Nesse Trabalho		VR%	Rótulo	Nesse Trabalho		VR%	Rótulo	Nesse Trabalho		VR%
		M ± DP*				M ± DP*				M ± DP*		
FI – 1	62	62	± 10	0	23	21	± 1	-9	89	87	± 4	-2
FI – 2	120	118	± 9	-2	42	40	± 2	-5	125	127	± 13	+2
FI – 3	104	102	± 10	-2	35	31	± 2	-11	114	106	± 4	-7
FI – 4	82	93	± 8	+13	27	48	± 12	+78	98	152	± 44	+55
FI – 5	132	79	± 13	-40	59	39	± 4	-34	169	151	± 18	-11
FI – 6	81	85	± 12	+5	44	48	± 4	+9	98	77	± 7	-21
FI – 7	105	122	± 6	+16	62	43	± 13	-31	135	143	± 8	+6
FI – 8	95	87	± 6	-8	37	25	± 8	-32	121	113	± 18	-7
FI – 9	149	143	± 8	-4	58	52	± 4	-10	192	165	± 21	-14
FI – 10	106	106	± 23	0	42	32	± 2	-24	134	107	± 4	-20
FI – 11	93	99	± 4	+6	37	35	± 2	-5	116	118	± 6	+2
FI – 12	57	57	± 6	0	24	22	± 2	-8	98	108	± 8	+10
FI – 13	84	86	± 16	+2	34	30	± 2	-12	120	124	± 8	+3
FI – 14	85	81	± 6	-5	27	25	± 2	-7	92	75	± 4	-18
FI – 15	129	111	± 4	-14	47	31	± 8	-34	125	112	± 6	-10
FI – 16	124	122	± 14	-2	36	30	± 2	-17	108	102	± 2	-6
FI – 17	125	131	± 4	+5	50	40	± 2	-20	112	108	± 6	-4

* média ± desvio-padrão; VR= variação do resultado obtido em relação à declaração do rótulo (- valores abaixo do declarado, + valores acima do declarado)

TABELA 7.13 – Concentrações dos elementos traço obtidos nas fórmulas infantis e valores dos rótulos e recomendações em mg/100kcal

Amostras	Fe mg/100 kcal			Se µg/100 kcal**			Zn mg/100 kcal		
	ANVISA (1 mg Fe/100 kcal) Codex (0,45 mg Fe/100 kcal)			ANVISA (não declarado) Codex (1 µg Se/100 kcal)			ANVISA (0,5 mg Zn/100 kcal) Codex (0,5 mg Zn/100 kcal)		
	Rótulo	Nesse Trabalho M ± DP*	VR%	Rótulo	Nesse Trabalho M ± DP*	VR%	Rótulo	Nesse Trabalho M ± DP*	VR%
FI – 1	1,2	1,2 ± 0,1	0	1,9	1,9 ± 0,6	0	0,8	0,9 ± 0,1	+13
FI – 2	1,7	1,7 ± 0,2	0	-	- ±	-	1,2	1,2 ± 0,1	0
FI – 3	1,2	1,2 ± 0,1	0	-	1,9 ± 0,9	-	1,2	1,3 ± 0,1	+8
FI – 4	1,2	1,2 ± 0,1	0	-	3,0 ± 0,6	-	0,9	0,9 ± 0,1	0
FI – 5	1,7	1,7 ± 0,1	0	-	- ±	-	1,0	1,0 ± 0,1	0
FI – 6	1,3	1,3 ± 0,1	0	-	4,0 ± 0,2	-	0,7	0,7 ± 0,1	0
FI – 7	1,7	1,7 ± 0,1	0	-	- ±	-	1,5	1,4 ± 0,1	-7
FI – 8	1,2	1,2 ± 0,1	0	-	1,2 ± 0,1	-	0,8	0,9 ± 0,1	+13
FI – 9	1,7	1,7 ± 0,1	0	-	1,4 ± 0,3	-	1,2	1,3 ± 0,1	+8
FI – 10	1,2	1,3 ± 0,1	+8	-	- ±	-	0,8	0,8 ± 0,1	0
FI – 11	1,2	1,2 ± 0,1	0	-	1,6 ± 0,6	-	0,8	0,8 ± 0,1	0
FI – 12	1,2	1,2 ± 0,1	0	-	1,0 ± 0,2	-	0,7	0,7 ± 0,1	0
FI – 13	0,6	0,6 ± 0,1	0	-	0,7 ± 0,1	-	0,8	0,7 ± 0,1	-13
FI – 14	1,2	1,0 ± 0,3	-17	2,3	2,1 ± 0,9	-9	0,8	0,8 ± 0,1	0
FI – 15	1,7	1,5 ± 0,2	-11	-	3,3 ± 0,2	-	1,1	0,5 ± 0,1	-55
FI – 16	1,5	1,5 ± 0,1	0	1,9	1,9 ± 0,4	0	1,3	1,3 ± 0,1	0
FI – 17	1,1	1,0 ± 0,1	-9	2,4	2,4 ± 0,1	0	0,9	0,8 ± 0,1	-11

* média ± desvio-padrão; ** Se em µg/100 kcal; VR= variação do resultado obtido em relação à declaração do rótulo(- valores abaixo do declarado, + valores acima do declarado)

Kashlan et al (1991) analisaram 23 fórmulas à base de leite de vaca e 6 fórmulas infantis à base de soja do comércio do Kuwait. Os níveis médios para as fórmulas infantis à base de leite fortificado com Fe não foram significativamente diferentes dos níveis de Fe obtidos nas fórmulas à base de soja. Os níveis de Fe para todas as fórmulas foram superiores ao mínimo recomendado de 1 mg/100kcal pela Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO, 1981) ou 0-18 mg/kcal pelo Registro Federal (Federal Register, 1985), exceto para dois produtos. Os resultados desse estudo mostraram que os níveis dos elementos estão de acordo com as recomendações do *Codex Alimentarius*, exceto para poucos produtos que apresentaram baixos teores de Fe, Zn e Cu. Variação no rótulo foi mais elevada para o Mn. A maioria das fórmulas à base de leite de vaca tinham a relação Zn:Cu acima dos limites permitidos. A concentração de Cu foi baixa e uma grande variação na concentração de Mn parecem ser um dos principais inconvenientes, para manter a boa qualidade da composição elementar das fórmulas infantis comercializadas no Kuwait. No presente trabalho, as concentrações de Fe variaram de 0,6-1,7 mg/100kcal e para o Zn de 0,5-1,4 mg/100kcal, nas amostras de fórmula infantil.

CAPÍTULO 8

8. CONCLUSÃO

O método de análise por ativação com nêutrons instrumental empregado nesse estudo, demonstrou ser adequado para determinar as concentrações dos elementos estudados, sendo corroborado pela precisão e exatidão da técnica demonstrada por meio dos resultados obtidos nos materiais de referência certificado, uma vez que os valores de desvio padrão relativo variaram de 2-14% e erro relativo de 1-18% para o material certificado NIST-SRM 1549 e de 3-10% e de 1-11% para o NIST-RM 8435.

A variação na faixa de concentração dos elementos nos dois grupos formados pela análise de *Cluster* indica que as concentrações nas amostras de leite materno podem ser associadas com outras características individuais das voluntárias e não somente a idade gestacional.

A análise dos resultados por meio dos gráficos de *Box-Plot* ressaltou que os resultados obtidos não apresentaram diferenças significantes nas concentrações de leite materno pré-termo com relação ao leite materno termo. Pelos resultados obtidos, pode-se observar que não houve diferenças nos teores dos elementos determinados em relação à idade gestacional.

Desse modo, cria-se a perspectiva de novos estudos com o número maior de voluntárias, a fim de estabelecer valores de referência para o leite materno colostro de mães brasileiras e compreender uma série de variáveis em

questão, tendo em vista que a variação nas concentrações pode estar relacionada a uma série de fatores individuais.

Para as fórmulas infantis, pode-se concluir que as concentrações dos macrominerais Ca, K e Na nas amostras analisadas de fórmulas infantis comercializadas na cidade de São Paulo estão, em sua maioria de acordo com os valores impressos nos rótulos e também estavam dentro dos intervalos recomendados pela ANVISA e pelo *Codex Alimentarius*. Em poucas amostras foram apresentados valores discrepantes para K e Na em relação aos declarados nos rótulos.

Os resultados deste estudo indicaram que a maioria de fórmulas infantis analisadas está dentro da recomendação dietética recomendada pela ANVISA e pelo *Codex Alimentarius* em relação aos teores de elementos essenciais maiores e traço. Somente a concentração do Fe para uma amostra estava mais baixa do que a recomendação da ANVISA. Os resultados mostraram que as fórmulas infantis à base de soja apresentaram valores de concentração para Se superiores às fórmulas à base de leite de vaca.

Estes dados incentivam estudos para determinar outros elementos essenciais e elementos tóxicos nas fórmulas infantis e em outras variedades de fórmulas de leite disponíveis no mercado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBÉ, M.R.L.; TRICK, K.D.; KOSHY, A. The selenium content of Canadian infant formulas and breast milk. **J. Food Comp. Anal.**, v. 9, p. 119-126, 1996.
- AGARWAL, R.; AFZALPURKAR, R.; FORDTRAN, J.S. Pathophysiology of potassium absorption and secretion by the human intestine. **Gastroenterol.** v.107, p. 548-571, 1994.
- AKANLE, O.A.; BALOGUN, F.A.; OWA, J.A.; SPRYROU, N.M. Study of the nutritional status of maternal breast milk in preterm infants in Nigeria. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 244, n.1, p. 231-235, 2000.
- AKRE J. Infant feeding: the physiological basis. **Bull WHO.** v. 67, p. 1-108, 1989.
- AL-AWADI, F. M.; SRIKUMAR, T.S. Trace element status in milk and plasma of kuwaiti and non-kuwati lactating mothers. **Nutr.**, v.16, p.1069-1073, 2000.
- ALMEIDA, A.A.; LOPES, C.M.P.V.; SILVA, A.M.S.; BARRADO, E. Trace elements in human milk: correlation with blood levels, inter-element correlations and changes in concentration during the first month of lactation". **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v.22, p. 196-205, 2008.
- ARNAULD, J.; FAVIER, A. Copper, iron, manganese and zinc in human colostrums and transitory milk of French women. **Sci. Total Environ.**, v.159, p. 9-15, 1995.
- ASHRAF, R.N.; JALIL, F.; APERIA, A.; LINDBLAD, B.S. Additional water is not needed for healthy breast-fed babies in a hot climate. **Acta paediatr.** v. 82, n. 12, p. 1007-1077, 1993.
- BARROSO, L.P. **Análise Multivariada.** Departamento de Estatística. Universidade de São Paulo, 2003.
- BEDINGHAUS, J.M; MELNIKOW, J. Promoting Successful Breast-Feeding Skills. **Am. Fam. Physic.**, v. 45, p.1309-1318, 1992.
- BELLATI, U.; POMPA, P.; LIBERATI, M. Valutazione analitica di una dieta "mediterranea" in gravidanza. **Minerva Ginecologica**, v.46, n.4, p.183-187, 1994.
- BENEMARIYA, H.; ROBBERECHT, H.; DEELSTRA, H. Copper, zinc and selenium concentrations in milk from middle-class women in Burudi (Africa) throughout the first 10 months of lactation. **Sci. Total Environ.**, v.164, p.161-174, 1995.
- BODE, P. Quality management at the analytical laboratory, an inevitable compliance with a new order. **J Anal Chem.**, v. 51, n. 12, p. 1153-1159, 1996.
- BODE, P.; DIJK, P. Operation management of results in INAA utilizing a versatile system of control charts. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 215, n.1, p. 87-94, 1997.

- BORTOLOZO, E.A.F.Q.; TIBONI, E.B; CÂNDIDO, L.M.B. Leite humano processado em bancos de leite para o recém-nascido de baixo peso: análise nutricional e proposta de um novo complemento. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, v. 16, n. 3, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico referente à Alimentos para Fins Especiais**. Diário Oficial da União, Portaria n.º 29, de 14/01/1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico para Promoção Comercial de Alimentos para Lactentes e Crianças de Primeira Infância**. Resolução RDC nº 222, de 05 de agosto de 2002.
- CÉSAR, J.A.; VICTORA, C.G.; BARROS, F.C.; SANTOS, I.S.; FLORES, J.A. Impact of breast-feeding on admission for pneumonia during postneonatal period in Brazil: nested case-control study. **BMJ**. v. 318, p. 1316-20, 1999.
- COMMITTEE ON NUTRITION OF THE AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS CON / AAP. Commentary on breast-feeding and infant formulas, including proposed standards for formulas. **Pediatrics**. v.57, p.279-285, 1976.
- COSTA, R.B.L; MONTEIRO, C.A. Consumo de leite de vaca e anemia na infância no Município de São Paulo. **Rev. Saúde Pública**. v.6, n.38, p.797-803, 2004.
- COSTA, R.S.S.; CARMO, M.G.T.; SAUNDERS, C.; LOPES, R.T.; JESUS, E.F.O.; SIMABUCOS, S.M. Trace elements content of colostrum milk in Brazil. **J. Food Comp. Anal.**, v.15, p.27-33, 2002.
- COSTA, R.S.S.; CARMO, M.G.; SAUNDERS, C.; JESUS, DE E.F.; LOPES, R.T.; SIMANBUCO, S.M. Characterization of iron, copper and zinc levels in the colostrum of mothers of term and preterm infants before and after pasteurization. **Intern. J. Food Scien. Nutr.**, v.54, p.111-117, 2003.
- COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**, 2ª ed., Barueri, SP: Manole, 2007.
- CURRIE, L.A. Limits for qualitative detection and quantitative determination, Application to Radiochemistry. **Anal. Chem.**, v.40, n.3, p.586-593, 1995.
- DÓREA, J.G. Iron and copper in human milk. **Nutr.**, v.16, p.209-220, 2000.
- DÓREA, J.G. Magnesium in human Milk. **J. of the Amer. Coll. of Nutr.**, v.19, n.2, p. 210-219, 2000.
- EEC – Commission Directive 96/04/CE of 14 February. **Off. J. Eur. Community**. n. L049, p.12-16, 1996.

- ESCOBAR, A.M.; OGAWA, A.R.; HIRATSUKA, M.; KAWASHITA, M.Y.; TERUYA, P.Y.; GRISI, S. Breastfeeding and socioeconomic cultural status: factors that lead to early weaning. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.*, v.2, p. 253-261, 2002.
- ESTADOS UNIDOS. Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride.** Whashington D.C., National Academic Press, Washington, D.C., 1997.
- ESTADOS UNIDOS. Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride.** Whashington D.C., National Academic Press, Washington, D.C., 2000.
- ESTADOS UNIDOS. Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for water, potassium, chloride and sulfate.** Whashington D.C., National Academic Press, Washington, D.C., 2004. p. 640.
- ESTADOS UNIDOS. Institute of Medicine. **DRIs – Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc.** Washington, D.C., National Academy Press, 2002.
- EUCLYDES, M.P. **Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação adequada.** Viçosa: Suprema; 2000.
- FANHANI, A.P.G; FERREIRA, M.P. Agentes antioxidantes: seu papel na nutrição e saúde dos atletas. *Sábios – Ver. Saúde e Biol.*, v.1, n.2, p. 33-41, 2006.
- FAO/WHO. “CAC/RS”, *Codex Alimentarius*, v. IX, p.72, 1982.
- FEDERAL REGISTER. Subpart D, 1007.100, **Nutr. Specifications.** v.50, n.210, 1985.
- FEELY, R.M.; EITENMILLER, R.R.; JONES, J.B. Copper, iron and zinc contents of human milk at early stages of lactation. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.37, p.443-448, 1983.
- FERREIRA, T.R.B; RIPAMONTE, C.; STELLA, L.C.; ALBADALEJO, R.G.C. Imunologia do leite materno. *Revista Perspectivas Médicas*, v.9, p.22-28, 1998.
- FAO/WHO Food Standards Programme. *Codex Alimentarius*. **Codex standards for foods for special dietary use including foods for infants and children and related code of hygienic practice.** Rome: FAO/WHO; 2000.
- FOOD AND NUTRITION BOARD. National Council, National Academy of Sciences. **Recommended dietary allowances.** 10thed. Washigton: National Academy Press, 1989.

- FOMON S. J. Bioavailability of supplemental iron in commercially prepared dry infant cereals. **J. Pediatr.**, v. 110, p. 660-661, 1987.
- FRAZÃO, S. V.; SAIKI, M. Study on trace element determinations in human head hair using neutron activation analysis. In: **International Nuclear Atlantic Conference 2007 INAC 2007** (VIII ENAN), Santos. Proceedings of the International Nuclear Atlantic Conference 2007- INAC 2007 (VIII ENAN), v. 1. p. 1-7, 2007.
- FULHAN, J.; COLLIER, S.; DUGGAN, C. Update on pediatric nutrition: breastfeeding, infant nutrition, and growth. **Cur. Opin. Pediatr.**, v. 5, p.323-332, 2003.
- GILL, K.P.; ZAIDI, J.H.; AHMAD, S. Radiochemical neutron activation analysis for trace elements evaluation of human milk. **Radiochim. Acta.**, v.91, p.547-551, 2003.
- GOOGLE. Localização do Hospital Estadual Sapopemba. Disponível em: <<http://maps.google.com.br>> Acesso em: 10 jan. 2009.
- HAMBRAEUS, L. **Leche Humana: aspectos nutricionales**. In: Nutritión clínica en la infancia. Brunser O, Carrazza FR, Gracey M, Nichols BL, Senterre J. Raven Press, New York, p. 289-301, 1985.
- HAMILL, T.W.; YOUNG, E.R.; EITENMILLER, R.R.; HOGARTY, C.D.; SOLIMAN, A.M. Ca, P, Mg, Zn, Cu, Mn, Na, K and Cl contents of infant formulas manufacture in the United States. **J. Food Comp. Anal.**, v.2, p.132-139, 1989.
- HANNAN, M.A.; DOGADKIN, N.N.; ASHUR, I.A.; MARKUS, W.M. Copper, selenium and zinc concentrations in human milk during the first three weeks of lactation. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.107, p.11-15, 2005.
- HOSPITAL ESTADUAL SAPOPEMBA (Foto). Disponível em: <www.hcnet.usp.br/historiahc/institutos2.htm>. Acesso em: 10 jan. 2009.
- IAEA. International Atomic Energy Agency. **Practical aspects of operating a neutron activation analysis laboratory**, IAEA – TECDOC – 564. Vienna, 1990.
- IKEM, A.; NWANKWOALA, A.; ODUEYUNGBO, S. Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES. **Food Chem.**, v.77, n. 4, p. 439-447, 2002.
- IOM (Institute of Medicine). Zinc. In: IOM (Institute of Medicine). Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: National Academic Press; p. 442-501, 2001.
- ITRIAGO, A.; CARRIÓN, N.; FERNÁNDEZ, A.; PUIG, M.; DINI, E. Zinc, copper, iron, calcium, phosphorus and magnesium content of maternal milk during the first 3 weeks of lactation. **Arch. Latinoam. Nutr.** v.47, n.1, p. 14-22, 1997.

- JENSEN, R.G. **Handbook of Milk Composition**. San Diego, Academic Press, Inc., 1995.
- JENSEN, R.G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. **J. of Dairy Science**, v.85, n. 2, p. 295-350, 2002.
- JOHNSON, P.E.; EVANS, G.W. *Relative zinc availability in human breast milk, infant formulas, and cow's milk*. **Amer. J. of Clin. Nutrit.** v.31, p.416-421, 1978.
- JÚNIOR, W.; ROMUALDO, G.S. **Anatomia e Fisiologia da Lactação**. In: CARVALHO, M.R.; TAMEZ, R.N. Amamentação - bases científicas para a prática profissional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.25-36, 2002.
- KASHLAN, N.B.; HASSAN, A.S.; SRIVASTAVA, V.P.; MOHANA, N.A.; SHUBBER, K.M. Elemental contents of milk-based and soy-based infant formulas marketed in Kuwait. **Food Chem.**, v.42, p.57-64, 1991.
- KAZAL, L.A.J. Prevention of iron deficiency in infants and toddlers. **Amer. Famil. Phys.**, v.66, n.7, p.1217-1224, 2002.
- KUMPULAINEN, J. Selenium: requirement and supplementation. **Acta Paediatr Scand. Suppl.**, v.351, p.114-117, 1989.
- LAKIND, J.S.; WILKINS, A.A.; BERLIN, C.H. Environmental chemicals in human milk: a review of levels, infant exposures and health, and guidance for future research. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.198, p.184-208, 2004.
- LASKEY, M.A. Breast-milk calcium concentrations during prolonged lactation in British and rural Gambian mothers. **Acta Paediatr. Scand. Suppl.**, v. 79, p.507-512, 1990.
- LAWRENCE, R.A. Breast-feeding. **Pediatr. Review**, v.11, n.6, p. 163-71, 1989.
- LAWRENCE R. A. The clinician's role in teaching proper infant feeding techniques. **J. Pediatr.** v. 126, p. 112-117, 1995.
- LEOTSINIDIS, M.; ALEXOPOULOS, A.; KOSTOPOULOU-FARRI, E. Toxic and essential trace elements in human milk from Greek lactating women: association with dietary habits and other factors. **Chemosphere**. Online, 2005.
- LEVANDER, O.A.; DELOACH, D.P.; MORRIS, V.C. Platelet glutathione peroxidase activity as an index of selenium states in rats. **J. Nutr.**, v.113, p.55-63, 1983.
- LÖNNERDAL, B.; KEEN, C.L.; OHTAKE, M.; TAMURA, T. Iron, zinc, copper and manganese in infant formulas. **Amer. J. Dis. Child.** v. 137, p. 433-437, 1983.
- LÖNNERDALL, B. Regulation of mineral and trace elements in human milk exogenous and endogenous factors. **Nutr. Rev.**, v.58, p.223-29, 2000.

- MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9ª ed. São Paulo: ROCA, 1998.
- MAIHARA, V. A.; MOURA, P. L. C.; CATHARINO, M. G. M.; CASTRO, L. P.; FIGUEIRA, R. C. L. Arsenic and cadmium content in edible mushroom from São paulo-Brazil determined by INAA and GF AAS. **J.of Radioanal. and Nucl. Chem.**, v. 278, p. 395-397, 2008.
- MARTINES, J.C.; REA, M.; ZOYSA, I. Breast feeding in the first six months: No need for extra fluids. **BMJ**. v.304, p. 1068-1069, 1992.
- MELO, R.; GELLEIN, K.; EVJE, L.; SYVERSEN, T. Minerals and trace elements in commercial infant food. **Food and Chem. Toxic.**, v.46, p. 3339-3342, 2008.
- MIKODE, M.S., WHITE, A.A. Dietary assessment of middle income pregnant women during the first, second and third trimesters. **J.of the Amer Diet Assoc**, Chicago, v.94, n.2, p.196-199, 1994.
- MORGANO, M.A.; SOUZA, L.A.; NETO, J.M.; RONDÓ, P.H.C. Composição mineral do leite materno de banco de leite. **Ciênc. Tecnolo. Aliment.**, v.25, n.4, p. 819-824, 2005.
- MORITO, N.S.; PLANELLS, E.; ARANDA, P. LLOPIS. Magnesium-manganese interactions caused by magnesium deficiency in rats. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.18, n.5, p.475-480, 1999.
- MOURA, P. L. C. ; MAIHARA, V. A. ; CASTRO, L. P. ; FIGUEIRA, R. C. L. . Essential trace elements in edible mushrooms by Neutron Activation Analysis. In: **International Nuclear Atlantic Conference INAC 2007** (VIII ENAN), 2007, Santos. Proceedings of the International Nuclear Atlantic Conference 2007- INAC 2007 (VIII ENAN),), v. 1. p. 1-6, 2007.
- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY (NIST). **Certificate of Analysis: Non Fat Milk Powder SRM – 1549**, Washington DC, July 29, 1985.
- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY (NIST). **Certificate of Analysis: Whole Milk Powder RM – 8435**, Washington DC, April 29, 1999.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) FOOD AND NUTRITION BOARD, Recommended dietary allowances (RDA). 10ª ed. National Academy of Science, Washington, 1989.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (USA). Recommended dietary allowances. Washington DC : National Academy Press, p. 283, 1989.
- NEIFERT, M.R. The Optimization Of Breast-Feeding In The Perinatal Period. **Clin. Perinatal**. v.25, n.2 p. 303-326, 1998.
- NÈVER, J. Physiological and nutritional importance of selenium. **Experientia**. v. 47, p.187-193, 1991.

- NEVILLE, M.C. Anatomy and Physiology of Lactation. ***Pediatr. Clin. North. Amer.***; v. 48, n.1, p. 13-34, 2001.
- NEVILLE, M.C.; MORTON, J.; UMEMURA, S. Lactogenesis – The Transition from Pregnancy to Lactation. ***Pediatr. Clin. North. Amer.*** v. 48, n. 1, p. 35-52, 2001.
- NUNES, K. P, MUNITA, C. S., NEVES, E. G. Estudo preliminar da Composição Química da Cerâmica do sítio Hatahara, AM. 1º Simpósio Latino Americano sobre Métodos Físicos e Químicos em Arqueologia, arte e Conservação do Patrimônio Cultural, ***LASMAC***, 11 a 16 de junho, MASP, São Paulo, Brazil, 2007.
- OH, M.S.U. Electrolytes, water, and acid-base balance. In: SHILS, M.E; OLSON, J.A.; SHIRE, M.; ROSS, A.C. ***Modern Nutrition in health and diseases***. 9th ed. Baltimore, Williams and Wilkins, p. 105-39, 1999.
- OSKI, F.A.; LANDAW, S.A. Inhibition of iron absorption from human milk by baby food. *Am J Dis Child* 1980;134:459-60.
- PARRY, S.J.; BENNETT, B.A.; BENZING, R.; LALLY, A.E. Radiochemical methods in nuclear waste management. ***J. Radioanal. Nucl. Chem.***, v.219, n.2, p.191-196, 2003.
- PICCIANO, M.F. Nutrient Composition of Human Milk. In: Schanler R ***J. Pediatr. Clin. North. Amer.***, v.48, n. 1, p. 53-67, 2001.
- PICCOT, D. Comunicação pessoal, 1989.
- PLESSI, M.; BERTELLI, D.; MONZANI, A. Determination of aluminum and zinc in infant formulas and infant foods. ***J. Food Comp. Anal.***, v.10, p. 36-42, 1997.
- ROSSIPAL, E.; KRACHLER, M. Pattern of trace elements in human milk during the course of lactation. ***Nutrit. Res.***, v.18, n.1, p.11-24, 1998.
- ROTRUCK, J.T.; POPE, A.L.; GANTHER H.E. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. ***Sci.*** v.179, p.588-590, 1973.
- SACHDEV, H.P.; KRISHNA, J.; PURI, R.K.; SATYANARAYANA, L.; KUMAR, S. Water supplementation in exclusively breast-fed infants during summer in the tropics. ***Lancet.***, v.337, p. 929–933, 1991.
- SAIKI, M. ; A.FUGA, ; E.R.ALVES ; VASCONCELLOS, M. B. A. ; MARCELLI, M. P. Biomonitoring of the atmospheric pollution using lichens in the metropolitan area of São Paulo city,Brazil. ***J. of Radioanal. and Nucl. Chem.***, v. 271, p. 213-219, 2007.
- SANTOS, J.O. Estudos Arqueométricos de Sítios Arqueológicos do Baixo São Francisco. **Tese de Doutorado** - IPEN/CNEN – USP, 2007a.

- SANTOS, P.S.; MAIHARA, V.M.; SAIKI, M. Determination of Br, Ca, Na, Fe, Rb, Se and Zn in milk formulas by Inaa. In **International Nuclear Atlantic Conference 2007 INAC 2007**. (VIII ENAN), Santos. Proceedings of the International Nuclear Atlantic Conference 2007- INAC 2007 (VIII ENAN), v. 1. p. 1-6, 2007b.
- SCARIATI, P.D. A longitudinal analysis of infant morbidity and the extense breastfeeding in the United States. **Pediatrics**. v.99, n.6, p. E5, 1997.
- SCHWARTZMAN, F. Avaliação nutricional, consumo e práticas alimentares, prevalência de constipação intestinal e anemia em pacientes com síndrome de rett: São Paulo. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de São Paulo, 2000.
- SILVA, L.S.V.; THIAPÓ, A.P.; SOUZA, G.G.; SAUNDERS, C. Micronutrientes na gestação e lactação. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v. 7, n.3, p.237-244, 2007.
- SILVESTRE, M.D.; LAGARDA, M.J.; FARRÉ, R.; MARTINEZ-COSTA,C.; BRINES, J. Copper, iron and zinc determinations in human milk using FAAS with microwave digestion. **Food Chem.**, v.68, p.95-99, 2000.
- SPENCER A, JONES J. Understanding breast-feeding: how to offer practical help. **Cur. Paediatr**. v.12, p. 93-97, 2002.
- SZIKLAI-LÁSZLÓ, I.; MAJCHRZAK, D.; ELMADFA, I.; CSER, A. Selenium and vitamin E concentrations in human milk and formula milk from Hungary. **J. of Radioanal. and Nucl. Chem.**, v.279, n. 2, 2009.
- THOMPSON, M.; WOOD, R. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Chemical Analytical Laboratories. **Pure Appl. Chem.**, v.65, p. 2123-2144, 1993.
- TORRES, M.A.; VERDOY, J.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.F.; LAGARDA, M.J. Selenium contents of human milk and infant formulas in Spain. **Sci. Total Environ.**, v.228, p.185-192,1999.
- TRAMONTE, V. L. C. G. . **Sódio, cloro e potássio**. In: Sílvia Maria Franciscato Cozzolino. (Org.). Biodisponibilidade de nutrientes. 2ª. ed. Barueri, São Paulo: Manole, v. 1, p. 437-455, 2007.
- VICTORA, C.G.; VAUGHAN, J.P.; LOMBARDI, C.; FUCHS, S.M.C.; GIGANTE, L.P.; SMITH, P.G. Evidence for protection by breastfeeding against infant deaths from infectious diseases in Brazil. **Lancet.**, v.2, p.319-22, 1987.
- VITOLO, M.R. **Nutrição da Gestação a Adolescência**. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Editores, 2003.
- WAPPELHORST, A.; KÜHN, I.; HEINDENREICH, H.; MARKERT, B. Tranfer of Selected Elements from Food into Human Milk. **Nutrition**. v.18, p.316- 322, 2002.

- WEIGEL, M.M.; NARVARÉZ, W.M.; AMPARO, L.; FÉLIX, C.; LÓPEZ, P. Prenatal diet, nutrient intake and pregnancy outcome in urban ecuadorian primiparas. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.41, n.1, p.21-37, 1991.
- WHEATER P.R; BURKITT HG, DANIELS VG. **Histología Funcional Texto Y Atlas En Color**. 2ª Ed. Editorial JIMS, p.289-307, 1987.
- WOLD, A.E.; ADLERBERTH,I. Does breastfeeding affect the infant's immune responsiveness. **Acta Pediatric**. v.87, n.1, p.19-22, 1998.
- WORLD HEALTH ASSEMBLY (WHA). **Infant and young child nutrition**. Resolution. WHA 54.2, 2001.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Trace element in human nutrition**. *Techn. Rep. Ser.* nº 532, 1973.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **International classification of diseases**, Geneva, v.1,1975.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **International Code of Marketing of Breast-milk Substitutes**. Geneva, 1981.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global strategy for infant and young child feeding: the optimal duration of exclusive breast-feeding**. Fifty-Fourth World Health Assembly. Document A54/INF.DOC./4, Geneva, 2001
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life**. Geneva, 2002.
- YAMAWAKI, N.; YAMADA, M.; KAN-NO, T.; KOJIMA, T.; KANEKO, T.; YONEKUBO, A. Macronutrient, mineral and trace elemnt composition of brest milk from Japanese women. *J. Trace Elem. Medic. Biol.*, v.19, p.171-181, 2005.
- YOUSEF, M.A.; NAWAL, O.; NICOLAAS, N.; MELITA, K.; ABDU, A. Trace element composition of plasma and breast Milk of well-nourished women. *J. of Envir. Sci.and Health part A.*, v.43, p. 329-334, 2008.
- ZAMBONI, C. B.; GENEZINI, F. A. Ativação Neutrônica. In: Cibeles Bugno Zamboni. (Org.). **Fundamentos da Física de Nêutrons**. 1 ed. São Paulo: Livraria da Física. v. 1, p. 89-102, 2007.

ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética para análise de Projeto de Pesquisa (CAPPesq)

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/06/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1106/07**, intitulado: "**AVALIAÇÃO DOS TEORES DE CÁLCIO, FERRO, SELÊNIO E ZINCO NO LEITE MATERNO DE MÃES DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMOS E A TERMO ADEQUADOS PARA A IDADE GESTACIONAL POR MEIO DA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO DE NÊUTRONS**" apresentado pelo Departamento de PEDIATRIA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisadoras Responsáveis: **Maria Esther Jurfest Ceccon e Vera Akiko Maihara**
Pesquisadores Executantes: **Vera Akiko Maihara; Paola de Souza Santos; Artur Figueiredo Delgado; Jane Oba; Maria Esther Rivero Ceccon; Flávio Adolfo Costa Vaz**

CAPPesq, 27 de Junho de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ANEXO 2 - Questionário

DATA ____/____/____

CÓDIGO: _____

Número do Prontuário _____

Dados Pessoais

Nome

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Data de nascimento ____/____/____

Idade anos

Raça : ☐ Branco

☐ Não branco

Naturalidade

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

Nacionalidade

☐ Brasileira

☐ Estrangeira

Endereço Residencial

☐ Área Urbana

☐ Área Rural

Telefone -

Celular -

Quanto tempo mora na mesma casa:

anos

meses

semanas

dias

Número de Gestação

Número de Parto

Número de Aborto

Existe alguma indústria perto da sua casa ☐ Sim ☐ Não

Saneamento básico ☐ Sim ☐ Não

Água de poço artesiano ☐ Sim ☐ Não

Fumante ☐ Sim ☐ Não Quantos cigarros por dia

Drogas ☐ Sim ☐ Não Qual? _____

Álcool / Cerveja ☐ Sim ☐ Não

Grau de escolaridade ☐ Ensino Fundamental I ☐ Ensino Médio

☐ Ensino Fundamental II ☐ Iltrado

☐ Ensino Superior

Trabalha ☐ Não trabalha ☐ Qual a profissão? _____

Alimentação (dieta)

Quantidade de refeições por dia

O que costuma comer nas refeições _____

O que costuma comer entre as refeições _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Dados da gestação

Nutrição materna

Peso pré concepção Kg

Peso durante a gravidez Kg

Estatura cm

Idade Gestacional

< 34 semanas - Pré-termo ☐

34 semanas - 36 6/7 semanas - Intermediário ☐

≥ 37 semanas - Termo ☐

≥ 42 semanas - Pós-termo ☐

Parto

Normal ☐ Cesárea ☐ Fórceps ☐ Outro _____

Tomou algum medicamento durante a gravidez? ☐ Sim ☐ Não

Qual (is) ? _____

Tomou algum suplemento vitamínico? ☐ Sim ☐ Não

Qual (is) ? _____

DADOS DO RECÉM-NASCIDO

Data de Nascimento ____/____/____

Horário ☐☐ hora(s)

☐☐ minuto(s)

Sexo ☐ feminino ☐ Masculino

Raça ☐ Branca ☐ Não branca

Peso do bebê _____ Kg Tamanho _____ cm

Boletim de APGAR _____

Intercorrências no bercário _____

DADOS DA GESTANTE

Foi feito algum exame preventivo ☐ Sim ☐ Não

Qual (is) ? _____

Patologia

☐ HIV positivo ☐ Hepatite ☐ Anemia Ferropriva ☐ Parasitose

☐ Outra (s) _____ Qual (is)? _____

Pressão Arterial ☐ Alterada ☐ Normal

Tipo de Anestésico ☐ peridural ☐ Local

☐ Raquianestesia

Responsável pela coleta □□□□□□□□□□□□□□□□

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Anexo 2 - Questionário

DATA ____/____/____

CÓDIGO: _____

Número do Prontuário _____

Dados Pessoais

Nome

Data de nascimento ____/____/____

Idade anos

Raça : ☐ Branco ☐ Não branco

Naturalidade

Nacionalidade

☐ Brasileira ☐ Estrangeira

Endereço Residencial

☐ Área Urbana

☐ Área Rural

Telefone -

Celular -

Quanto tempo mora na mesma casa:

anos

meses

semanas

dias

Número de Gestação ☐ Número de Parto ☐ Número de Aborto ☐

Existe alguma indústria perto da sua casa ☐ Sim ☐ Não

Saneamento básico ☐ Sim ☐ Não

Água de poço artesiano ☐ Sim ☐ Não

Fumante ☐ Sim ☐ Não Quantos cigarros por dia ☐☐

Drogas ☐ Sim ☐ Não Qual? _____

Álcool / Cerveja ☐ Sim ☐ Não

Grau de escolaridade ☐ Ensino Fundamental I ☐ Ensino Médio

☐ Ensino Fundamental II ☐ Iltrado

☐ Ensino Superior

Trabalha ☐ Não trabalha ☐ Qual a profissão? _____

Alimentação (dieta)

Quantidade de refeições por dia ☐☐

O que costuma comer nas refeições _____

O que costuma comer entre as refeições _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Dados da gestação

Nutrição materna

Peso pré concepção Kg

Peso durante a gravidez Kg

Estatura cm

Idade Gestacional

< 34 semanas - Pré-termo ☐

34 semanas - 36 6/7 semanas - Intermediário ☐

≥ 37 semanas - Termo ☐

≥ 42 semanas - Pós-termo ☐

Parto

Normal ☐ Cesárea ☐ Fórceps ☐ Outro _____

Tomou algum medicamento durante a gravidez? ☐ Sim ☐ Não

Qual (is) ? _____

Tomou algum suplemento vitamínico? ☐ Sim ☐ Não

Qual (is) ? _____

DADOS DO RECÉM-NASCIDO

Data de Nascimento ____/____/____

Horário ☐☐ hora(s)

☐☐ minuto(s)

Sexo ☐ feminino ☐ Masculino

Raça ☐ Branca ☐ Não branca

Peso do bebê _____ Kg Tamanho _____ cm

Boletim de APGAR _____

Boletim APGAR			
Sinal/Nota	0	1	2
Frequência cardíaca	ausente	menor que 100	maior que 100
Esforço respiratório	ausente	irregular	bom, choro
Tono muscular	flácido	alguma reflexão	movimentos ativos
Irritabilidade reflexa (cateter nasal ou estímulo plantar)	ausente	movimento	choro forte
Cor	azul, pálido	róseo, extremidades cianóticas	róseo

Exija o Boletim APGAR e verifique o que foi feito com o bebê. Se a nota for igual ou superior a 8 o bebê é normal. Se estiver entre 4 e 7 será considerado de risco e precisa de estimulação imediata. Se estiver entre 0 e 3 será considerado de alto risco e já precisará de uma intervenção médica mais específica.

Intercorrências no bercário _____

DADOS DA GESTANTE

Foi feito algum exame preventivo ☐ Sim ☐ Não

Qual (is) ? _____

Patologia

☐ HIV positivo ☐ Hepatite ☐ Anemia Ferropriva ☐ Parasitose

☐ Outra (s) _____ Qual (is)? _____

Pressão Arterial ☐ Alterada ☐ Normal

Tipo de Anestésico ☐ peridural ☐ Local

☐ Raquianestesia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PROTOCOLO

Hospital Estadual de Sapopemba

Código _____

Data da coleta ____/____/____

Forma de Coleta ☐ Manual ☐ Equipamento auxiliar

Peso do recipiente vazio , g

Peso do recipiente + leite , g

Peso do leite (Tare) , g

Recipiente tipo ☐ polietileno ☐ outro Qual? _____

[illegible]

Responsável pela coleta □□□□□□□□□□□□□□□□

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO.:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Avaliação dos teores dos micronutrientes cálcio, ferro, selênio e zinco presentes em leite de mães de pré-termos e termos adequados para a idade gestacional: aplicação do método de Análise por ativação com Nêutrons

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: 1-Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon e 2-Vera Akiko Maihara

CARGO/FUNÇÃO: 1-Responsável pela Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal do Instituto da Criança e Coordenadora do Berçário Anexo à Maternidade do Hospital Estadual de Sapopemba, ligado ao HC-FMUSP.....

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .40229.....

UNIDADE DO HCFMUSP: .Instituto da Criança do Departamento de Pediatria do HC-FMUSP e Hospital Estadual de Sapopemba

2-Doutor em Ciências pelo Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Química-Pesquisadora Senior do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares-IPEN-CNEN/SP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☒ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA :1 ano.....

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa – Este trabalho vai observar se seu leite contém todas as substâncias nutritivas e que são importantes para a alimentação do seu bebê
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais : será coletado uma amostra pequena de leite (5 ml) materno, entre o primeiro e 4 dia pós-parto, quando o parto for prematuro e 10 ml quando for de termo,. Estas quantidades de leite não vão interferir com o horário da mamada, nem diminuir a produção de leite, nem prejudicar seu bebê.
3. desconfortos e riscos esperados - pode sentir um pequeno desconforto no seio, na hora da coleta do leite que será realizada de forma manual o com bomba, porém não há nenhum risco.
4. benefícios que poderão ser obtidos – Com os resultados do trabalho conheceremos melhor a composição das substancias nutritivas do seu leite e prevenir possíveis deficiências na nutrição dos bebês
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.- não há

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas: sim
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.: Sim
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Sim
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa:Sim
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa: Sim

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Maria Esther Jurfest Ceccon: rua Apiacás 570, apto 104. Telefone residencial: 38641908, celular: 71641246

Vera Akiko Maihara: Rua Miosotis 274-Mirandópolis-Telefone residencial: 55817825, celular: 93843641

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2.....

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)