

GISELE LEITE DE ABREU

**Comparação dos ácidos graxos essenciais no leite da mãe do prematuro e da
mãe do bebê a termo nas diferentes fases da lactação**

CAMPO GRANDE

2016

GISELE LEITE DE ABREU

Comparação dos ácidos graxos essenciais no leite da mãe do prematuro e da mãe do bebê a termo nas diferentes fases da lactação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Durval Batista Palhares

CAMPO GRANDE

2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^o Durval Batista Palhares

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof^o Dr^o Joel Alves Lamounier

Instituição: Universidade Federal de São João del-Rei

Prof^a. Dr^a Carmem Silvia Martimbianco de Figueredo

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof^a. Dr^a Leila Simone Foerster Merey

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

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

Albert Einstein

DEDICO ESTE TRABALHO

À Deus e a Nossa Senhora,

por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

“Se Deus encheu tua vida de obstáculo, é porque Ele acredita na tua capacidade de passar por cada um.”

À Minha família,

pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. Que sempre me impulsiona em direção às vitórias dos meus desafios.

AGRADECIMENTOS

Durante esses anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Agradeço ao meu atual orientador **Profº Drº Durval Batista Palhares** por acreditar novamente em minha capacidade, pelas orientações, incentivo e dedicação. Sem o apoio de vocês dois nada seria possível.

Agradeço a minha primeira orientadora **Profª Drª Carmem Silvia Martimbianco de Figueiredo**, por acreditar que eu era capaz, pela orientação e pela força que me deu até aqui.

A todos que trabalham na **Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região do Centro-oeste**, o meu agradecimento por toda a atenção desempenhada nesses anos.

A **Prof. Dra. Priscila Aiko Hiane e Prof. Dr. Emanuel Mendes Ramos Filho**, pela padronização da técnica e pela contribuição essencial neste trabalho.

Ao amigo **Denis Okoba** por sua paciência, dedicação, compromisso e disponibilidade em me ajudar sempre.

Aos que trabalham no **banco de leite humano da UFMS**, muito obrigada pelo apoio e ajuda desempenhada nas coletas.

A **Joyce Mara Barbosa** pela contribuição essencial na análise das amostras.

A **CAPES** pela ajuda financeira.

As **participantes da pesquisa** que disponibilizaram o seu leite, sem vocês este estudo não existiria.

RESUMO

Abreu, GA. Comparação dos ácidos graxos essenciais no leite da mãe do prematuro e da mãe do bebê a termo nas diferentes fases da lactação. Campo Grande, 2016. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul]

Alguns componentes do leite materno são considerados de extrema importância como, por exemplo, os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPICL), como por exemplo: ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3), ácido araquidônico (AA, 20:4n-6) e o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3).

O objetivo do estudo foi comparar a quantidade de DHA, AA e EPA no leite de mães de termos e prematuros nas diferentes fases da lactação, sendo estas: colostro, transição e maduro, devido a sua grande importância na vida deste recém-nascido.

Participaram do estudo 47 lactantes, com idade entre 14 – 43 anos, sendo 23 alocadas no grupo prematuro (GP) e 24 no grupo termo (GT). Para a determinação dos AGPICL no leite materno (substrato), utilizou-se o método de Lepage, Roy (transesterificação direta dos lipídios). A quantificação dos mesmos foi por meio da cromatografia gasosa. Houve menor média do AA no leite de transição de mães de recém-nascidos prematuros em comparação com os termos ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística ao se comparar a quantidade de DHA, EPA e AA no leite do GP e o GT, apenas o leite de transição do GT apresentou maior quantidade do AA. A concentração de EPA em ambos os grupos e em todas as fases foi maior, pois aproximadamente 5% do ALA é convertido em EPA e apenas 0,5% é convertido em DHA, o que justifica a alta concentração de EPA e a baixa concentração de DHA. Ao comparar as concentrações de AGPICL nas 3 fases do leite nos grupos GP e GT, observa-se que apesar dos valores estarem acima das quantidades demonstradas em outros estudos em cidades brasileiras, ainda permanece abaixo dos valores ideais recomendados pela OMS. Por isso há necessidade de aumentar a ingestão de alimentos ricos em ômega 3 e 6 e diminuir o consumo de AGT, não só objetivando aumentar esses índices no LH, e sim a evolução nos hábitos alimentares e seu impacto positivo na saúde pública.

Palavra-chave: Ácidos graxos poli-insaturados, leite humano, prematuridade.

ABSTRACT

Abreu, GA. **Comparison of essential fatty acids in preterm mother's milk and the baby's mother term in different stages of lactation.** Campo Grande, 2016. [Thesis, Federal University of Mato Grosso do Sul]

Some components of mother's milk is considered of utmost importance, for example, polyunsaturated fatty acids, long chain (AGPICL), these being: docosahexaenoic acid (DHA , C22: 6n -3), arachidonic acid (ARA, 20: 4N- 6) and eicosapentaenoic acid (EPA , C20: 5n -3).

This study aims to compare the amount of DHA, ARA and EPA in milk from mothers of preterm and at term births due to its great importance in the life of this newborn. Forty-seven lactating women aged 14-43 participated in this study. Among these 23 were part of the preterm group (PG) and 24 were part of the at term group (GT). The extraction and the direct transesterification of DHA/ EPA/AA was carried out using the Lepage & Roy method and the quantifying LPUFA's was by gas chromatography. There was a lower average ARA in transitional milk of mothers of preterm infants in comparison with those with at term infants ($p < 0,05$). There was no statistical difference when comparing the amount of DHA, EPA and AA in the milk of GP e o GT in the milk of GP e o GT, only the GT transition milk had higher amounts of AA. The concentration of EPA in both groups and at all stages was greater, for approximately 5% of ALA is converted to EPA and only 0.5% is converted to DHA, which justifies the high concentration of EPA and the low concentration of DHA. By comparing the concentrations of AGPICL the 3 phases of milk in the group GP and GT, it is noted that although the values are above the amounts shown in other studies in Brazilian cities, still remains below the ideal values recommended by WHO therefore no need to increase the intake of foods rich in omega 3 and 6 and decrease the consumption of AGT, not only aiming to increase these rates in LH, but the evolution in eating habits and their positive impact on public health.

Keywords: Polyunsaturated fatty acids, human milk, prematurity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AG	Ácidos Graxos
AGE	Ácidos Graxos Essenciais
AGPI	Ácidos Graxos Poli-insaturados
AGPICL	Ácidos Graxos Poli-insaturados de Cadeia Longa
AGT	Ácido Graxo <i>Trans</i>
AL	Linoléico
ALA	α – linolênico
AM	Aleitamento Materno
AME	Aleitamento Materno Exclusivo
ANS	Agência Nacional de Saúde
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
DF	Distrito Federal
DHA	Ácido docosahexaenóico
DHEG	Doença Hipertensiva Específica da Gestação
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DPP	Descolamento Prematuro de Placenta

EAS	Elementos e Sedimentos Anormais
ERG	Eletrorretinograma
EPA	Eicosapentaenóico
FDA	Food and Drug Administration
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
LH	Leite Humano
LM	Leite Materno
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNDS	Pesquisa Nacional em Demografia e Saúde
RPM	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
TN	Terapia Nutricional
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número e porcentagem de gestantes segundo variáveis de identificação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – 2016	38
Tabela 2	Número e porcentagem de gestantes segundo hábitos e variáveis clínicas das gestantes, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – 2016	39
Tabela 3	Número e porcentagem de gestantes segundo o uso de drogas durante a gestação, Universidade Federal de Mato grosso do Sul – 2016	41
Tabela 4	Número e porcentagem de gestantes segundo a ocorrência de intercorrência na gestação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2016	43
Tabela 5	Média e desvio padrão (DP) da concentração do DHA, EPA e AA nas 3 fases do leite no GP e GT, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2016	44

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Graus
ng	Nanograma
mg	Miligramma
Kg	Quiilograma
mm	Milímetro
cm	Centímetro
ml	Mililitro
µl	Microlitro

LISTA DE APENDICES

- | | |
|--------------|--|
| Apêndice I | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) |
| Apêndice II | Instrumento para coleta de dados (ficha cadastral) |
| Apêndice III | Declaração de Autorização – Núcleo do Hospital
Universitário – UFMS |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura dos ácidos ômega - 3 e 6	20
Figura 2 -	Metabolismo dos ácidos graxos das famílias n-6 e n-3.....	21
Figura 3 -	Aparelho de Banho-maria	35
Figura 4 –	Cromatógrafo	36
Figura 5 -	Coluna cromatográfica	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 Ácidos Graxos	18
2.2 Ácidos Graxos Essenciais (AGE)	18
2.3 Classificação dos ácidos graxos	19
2.4 Fontes de AGPICL	22
2.5 Ácido graxo <i>trans</i>	23
2.6 Leite materno	23
2.7 A importância dos AG no leite materno para os bebês pré-termo	25
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.1 Objetivo Específico	32
4 MATERIAL E MÉTODO	33
4.1 População	33
4.2 Critérios de Inclusão	33
4.3 Critérios de não-inclusão	33
4.4 Critérios de Exclusão	34
4.5 Amostras de Leite	34
4.6 Determinação Laboratorial	34
4.7 Extração e Preparo da Amostra para a Quantificação de DHA, EPA e AA..	35
4.8 Cromatografia Gasosa	36
4.9 Análise Estatística	37
4.10 Considerações Éticas	37
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO	44
8 REFERENCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2001, determinou que o leite materno fosse o único e exclusivo alimento a ser ofertado até o sexto mês de vida, permanecendo até os dois anos como nutrição complementar (OMS, 2003).

O leite humano (LH) é a melhor estratégia de alimentação, pois previne a morte infantil e promove a saúde mental e física tanto da mãe quanto da criança. O mesmo é completo e provê todas as necessidades do bebê nos primeiros meses de vida. Resultando em menor prevalência de infecções no trato gastrointestinal e respiratório, apresenta melhor imunidade e proteção contra o desenvolvimento de doença atópica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; DOHERTY *et al.*, 2012; GRANOT *et al.*, 2011).

Alguns componentes do leite materno são considerados de extrema importância, como por exemplo, os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPICL), que estão diretamente relacionados com o desenvolvimento físico e mental. Os benefícios destes ácidos graxos essenciais (AGE) para a saúde do ser humano são inúmeros tais como redução de doenças cardiovasculares, respiratórias, reumáticas, neurológicas, oftalmológicas, psiquiátricas e inflamatórias (GARNEAU, 2012; ADARME-VEGA, 2012; TANG, 2012; SHEN, 2012).

Um dos AGE de maior importância é o ácido docosahexaenóico (DHA; C22:6; n-3) é essencial para o funcionamento normal da célula cerebral e do sistema nervoso central. Por isso, manter os níveis ideais deste AGPICL no organismo é indispensável para aprendizagem, cognição e memória. Outros componentes presentes no cérebro são o ácido araquidônico (AA; 20:4; n-6) e o ácido eicosapentaenóico (EPA; C20:5; n-3). Esses ácidos graxos (AG) formam os principais componentes do cérebro e fosfolipídios das membranas de células retiniais, acumulando no cérebro do feto no último trimestre gestacional e na primeira infância, principalmente o DHA, o qual é transportado através da placenta para a maturação do feto. Porém, a disponibilidade destes AGPICL é influenciada pela paridade, dieta materna e síntese nas glândulas mamárias, apesar de ser mínima essa produção, além disso, à medida que a amamentação progride a concentração de DHA no leite diminui (HACIOGLU *et al.*, 2012; IMHOFF-KUNSCH B. *et al.*, 2011).

Morse (2012) relatou em seu estudo que ensaios de intervenção utilizando a suplementação de DHA, observaram melhor desenvolvimento dos olhos e a

acuidade visual superior quando comparadas com crianças não suplementadas. Em relação ao desenvolvimento cerebral apresentaram capacidade avançada em resolução de problemas. Com essas evidências a ingestão materna de AGPICL durante a gravidez e lactação é essencial para adequada formação celular da membrana cerebral e do sistema nervoso central. Garantindo assim o desenvolvimento fetal saudável, incluindo o peso, perímetro cefálico e altura ao nascer. Alguns estudiosos relataram que o DHA pode prolongar a gestação de alto risco, melhorar o desenvolvimento infantil e acuidade visual, eficiência no processamento de atenção, melhores resultados neurológicos, capacidade de resolução de problemas de processamento de informação e, além disso, pode reduzir a incidência de “desenvolvimento lento”.

O presente estudo visou à comparação da quantidade de DHA, EPA e AA no leite de mães de recém-nascidos de termo e prematuros, devido a sua grande importância na vida deste recém-nascido.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Ácidos graxos

Atualmente o estilo de vida trouxe uma série de alterações na alimentação da população, a alta ingestão de gordura saturada e gordura *trans*, principalmente em produtos processados, vêm aliada ao baixo consumo de gordura poli-insaturada. Podendo afetar diretamente na organização da membrana plasmática celular e consequentemente no metabolismo e na saúde (MEREY, 2014) Cerca de quase 98% da gordura presente nos alimentos estão na forma de triglicérides, composto por uma molécula de glicerol, esterificada a três ácidos graxos sendo: saturados, monoinsaturados, poli-insaturados e trans (LOTTEMBERG, 2009).

Segundo Silva (2014), os AG são classificados como lipídeos simples, constituintes dos lipídeos mais complexos. Além dos mesmos participarem das estruturas das membranas celulares, carregam nutrientes lipossolúveis como: vitaminas e carotenoides, são precursores da síntese de hormônios e também participam da mediação de algumas funções celulares (LOTTEMBERG, 2009; PINHEIRO, 2010).

O AG é um dos 3 componentes principais do organismo, juntamente com o carboidrato e a proteína. Além de desempenhar papel fundamental como substrato energético, cerca de 30% do consumo total de energia do corpo humano (TVRZICKA *et al*, 2011). Alguns pesquisadores demonstraram que há associação com a liberação de endorfinas no cérebro e o consumo de gordura na dieta, possibilitando sensação agradável (PINHEIRO, 2010).

2.2 Ácidos Graxos Essenciais (AGE)

Widdowson (1968) descreveu a importância dos lipídios no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), porém recentemente que houve maior interesse nos benefícios dos mesmos. Sabe-se que a dieta inadequada rica em gordura, influencia diretamente no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como por exemplo, a cardiovascular (LOTTEMBERG, 2009).

Os AGE estão presente nos alimentos e compõem 4 classes, o oleico (ômega-9) presente nas frutas oleaginosas, o palmítico ou hexadecanóico (ômega-7)

sendo este o mais abundante na dieta humana, e está presente nos derivados do leite (manteiga e queijo) e na carne bovina, o alfa linolênico (ômega-3) e linoleico (ômega-6), os quais os seres humanos são incapazes de biossintetizar e deverão ser necessariamente adquiridos através da dieta. A deficiência do AGE leva a diversas alterações neurológicas, imunológicas, na pele, sérios transtornos comportamentais e no crescimento da criança (TINOCO, 2007; SILVA, 2007; TORRES, 2009; LIMA *et al*, 2004; AGOSTINI, 2008).

2.3 Classificação dos ácidos graxos

Os AG em geral contêm longas cadeias de ácidos sendo composto por 4 a 36 carbonos, sendo principalmente na forma esterificados a triglicerídeos, colesterol e fosfolipídios que constituem as membranas celulares (APPOLINÁRIO *et al.*, 2011). A extensão da cadeia carbônica é que determina a classificação em: cadeia curta (2 a 4 átomos de carbono), cadeia média (6 a 10 átomos de carbono) e a cadeia longa (acima de 12 átomos de carbono) (SILVA, 2014).

São classificados também de acordo com as insaturações: saturados contendo apenas uma ligação simples, monoinsaturados com apenas uma dupla ligação e poli-insaturados duas ou mais ligações duplas. Além disso, podem ser classificados quanto à localização da primeira ligação dupla da cadeia de carbono a partir do terminal metila, identificado pela letra n em conformidade com a IUPAC¹ (International Union of Pure and Applied Chemistry) (APPOLINÁRIO *et al.*, 2011; LOTTEMBERB, 2009).

Os ácidos que compõem a família ômega-6 são: o ácido linoléico (18:2n-6, AL) e o araquidônico (20:4n-6, AA), já os que pertencem à família ômega-3 são: o ácido alfa-linolênico (18:3n-3, ALA), o eicosapentaenóico (20:5n-3, EPA) e docosahexaenóico (22:6n-3, DHA). Conforme ilustrado na figura 1 a primeira insaturação no sexto carbono, enumerado a partir do grupo metil terminal, para a família ômega-6 e, na família ômega 3 está no terceiro carbono (MEREY, 2014).

¹A União Internacional de Química Pura e Aplicada é uma organização não governamental internacional dedicada ao avanço da química. Foi criada em Genebra no ano de 1919. (www.iupac.org)

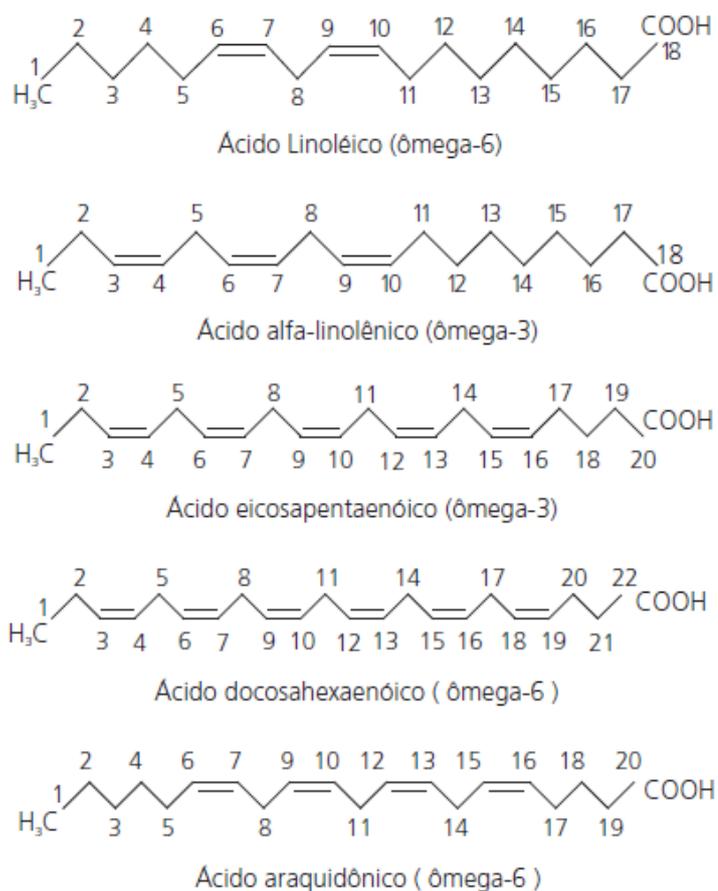
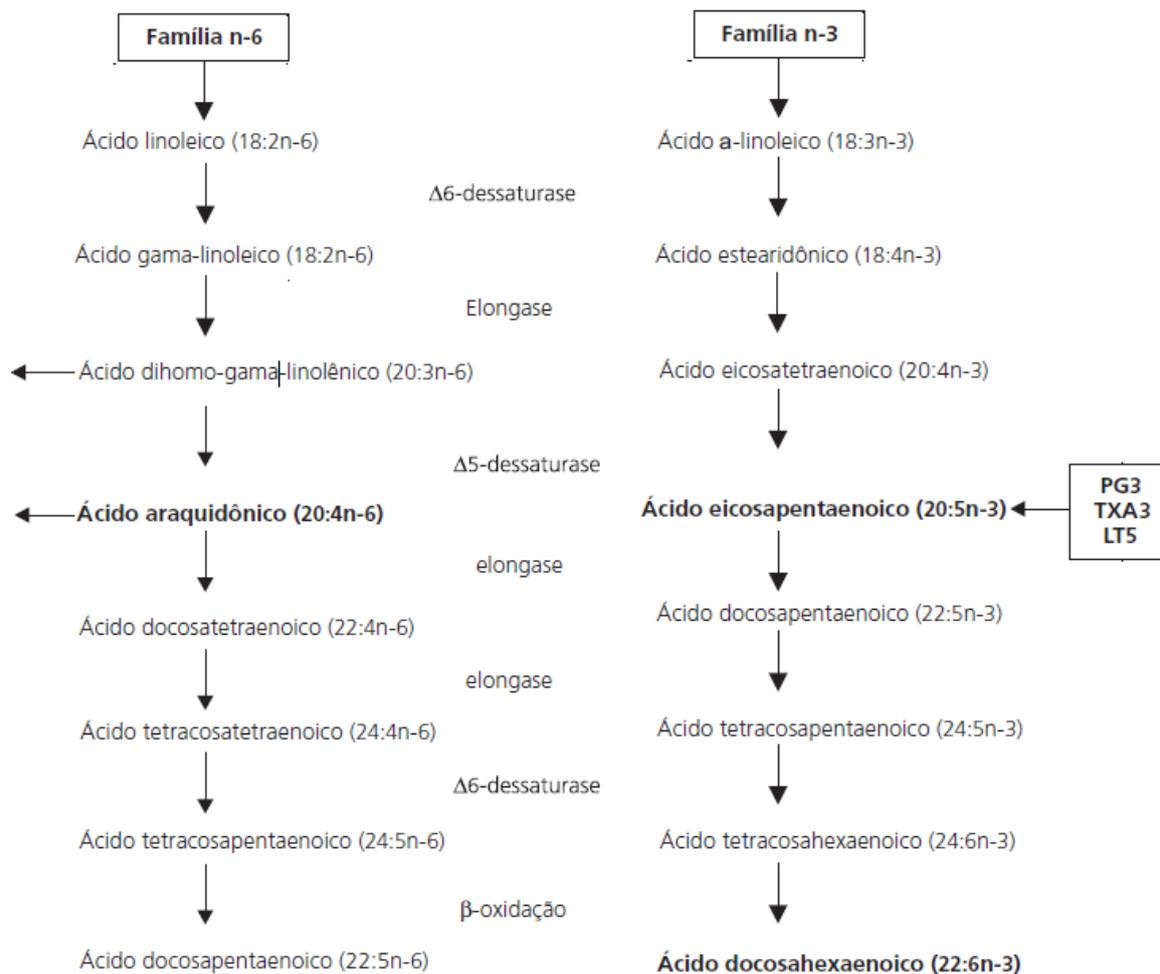


Figura 1 – Estrutura dos ácidos ômega - 6 e 3.

Fonte: Merrey, 2014.

Os mamíferos são incapazes de sintetizar os AGPICL, porém são capazes de biossintetizar os mesmos a partir dos AG ALA e do AL, quando adquiridos através da alimentação, sendo precursores dos ácidos: EPA, DHA e o AA (Figura 2) (TINOCO, 2007; LIMA *et al*, 2004; AGOSTINI, 2008; MEREY, 2014).

Os benefícios em relação aos AGPICL são descritos na literatura como, por exemplo, dentre os inúmeros efeitos biológicos destaca-se: diminuição da resposta inflamatória, redução do nível de triglicérides e do risco de arritmias. Possuem também efeitos anti teratogênicos, reduz a agregação de plaquetas, contribuindo assim para a proteção contra doença cardiovascular (OPPERMAN, 2011).



Nota: Prostaglandinas série 1; PG2: prostaglandinas série 2; PG3: prostaglandinas série 3; TXA1: tromboxanos série 1; TXA2: tromboxanos série; TXA3: tromboxanos série 3; LT4: leucotrienos série 4; LT5: leucotrienos série 5.

Figura 2 – Metabolismo dos ácidos graxos das famílias n-6 e n-3.

Fonte: Merey, 2014.

A estrutura e a função das séries ômega-3 e ômega-6 são diferentes, contendo metabólitos de atividades fisiológicas distintas. Com ação específica das enzimas lipoxigenases e cicloxigenases, o AL é precursor da prostaglandina da série 2 e leucotrienos da série 4, estes possuem efeitos inibitórios ou estimulatórios da resposta imune. Ao mesmo tempo em que, o ALA condiciona a prostaglandina da série 3 e leucotrieno da série 5, sendo estes responsáveis pelos efeitos supressores, como: inibir a proliferação de linfócitos, produzir anticorpos e citocinas, realizando assim ação anti-inflamatória no organismo (SILVA, 2014; PERINI, 2010).

Os tecidos que sintetizam o DHA e a EPA no corpo humano são as gônadas, o fígado e, em menor proporção, o tecido adiposo e o cérebro. Contudo, essa

capacidade é limitada e, para garantir a quantidade ideal desses ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), é necessário complementar na dieta. A deficiência do AGE leva a diversas alterações neurológicas, imunológicas na pele, sérios transtornos comportamentais e no crescimento da criança (TINOCO, 2007; SILVA, 2007; TORRES, 2009; AGOSTINI, 2008).

Segundo Davis e Tassinari (2011) A variante da quantidade dos AGPICL, particularmente a diminuição, nas membranas sinápticas pode comprometer a estrutura com a alteração das propriedades físico-química, o desempenho neuronal, a função dos receptores, dos transportadores e dos canais iônicos. Dentre as células especializadas do SNC, as mais afetadas são os oligodendrócitos seguido dos neurônios. O AA juntamente com o DHA são os principais AG presentes no cérebro do ser humano (SILVA, 2007). Já o EPA e DHA são considerados elementos chave do desenvolvimento das células neuronais e da retina dos embriões estando assim, intimamente relacionadas com o neurodesenvolvimento infantil que se completa até os dois anos de idade (SILVA, 2014; FONSECA et al., 2013).

Os AGPICL apresentam papel essencial no amadurecimento neuronal, transmissão de sinais e excitabilidade das membranas neurais, e na expressão de genes que regulam a diferenciação celular e o desenvolvimento. O DHA além de ser imprescindível para o crescimento da criança, e é o AGPICL com maior presença nos segmentos da retina, e a deficiência do mesmo no tecido retinóico pode ser confirmada por testes de amplitude do eletrorretinograma e de exames de acuidade visual (AGOSTINI, 2008).

2.4 Fontes de AGPICL

O ômega-6 pode ser encontrado em grande quantidade no óleo e sementes de milho, girassol e soja. Enquanto que o ômega-3 é encontrado principalmente em crustáceos, algas, moluscos e pescados tais como: atum, sardinha, salmão, anchova, truta, bacalhau e jurel, este apresenta maior quantidade de AGPICL e é encontrado no Chile, o teor do ômega-3 nestes alimentos descrito pode variar em até 25%. Além dessas fontes também podemos encontrar o ômega-3 em alguns frutos oleaginosos, sementes, vegetais, gema de ovo e carnes de ruminantes (SILVA, 2014; MEREY, 2014; TINOCO, 2007).

Um estudo publicado recentemente demonstrou que o consumo total de DHA e EPA no Brasil é baixo, pois o consumo de peixe chega a ser dez vezes menor se comparado com a carne bovina em áreas urbanas. Concluindo que a população brasileira, em especial as grávidas e lactantes, está longe de chegar à recomendação ideal de ingestão de DHA (TORRES, 2009).

2.5 Ácido Graxo *trans* (AGT)

Os óleos que são hidrogenados parcialmente na industrialização, são utilizados na produção de gorduras comestíveis com características e texturas peculiares. É neste processo que são formados os AGT, sendo isômeros geométricos, apresentando a mesma configuração, porém com estrutura diferente molecular. O ácido oleico *trans* é o ácido elaídico (C18:1 *trans*-9). Sendo encontrado em bolachas recheadas, biscoitos, empanados tipo *nuggets*, sorvetes cremosos, tortas e *fast-foods* (PINHEIRO, 2010; LOTTEMBERB, 2009).

2.6 Leite Materno

A lactação é uma função única e fisiológica dos mamíferos, tornando-se inquestionavelmente o melhor alimento para os mesmos. Além de completar o processo reprodutivo e ter grande importância na saúde materna (NOGUEIRA, 2009; OMS, 2003). A terapia nutricional (TN) ideal para o recém-nascido (RN) humano tanto a termo como pré-termo é o LH, pois é um alimento que melhor se adapta às necessidades nutricionais, imunológicas e psicológicas dos bebês (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2005). A OMS juntamente com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) tem desempenhado um esforço com abrangência mundial objetivando promover, proteger e amparar o aleitamento materno (AM). A Sociedade Européia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica e a Sociedade Européia de Alergologia e Imunologia Clínica Pediátrica também sugerem o AM exclusivo até o 6º mês de vida, reduzindo assim a incidência de manifestações alérgicas. Sendo igualmente recomendado pela sessão de alergia e imunologia da Sociedade Americana de Pediatria. (CHEMELLO, 2010)

Por inúmeras vantagens que oferece o LH, em 2001, a OMS implantou a recomendação do AM exclusivo até o sexto mês de vida, e a partir desta idade

iniciar a introdução de alimentos gradativamente permanecendo ainda com a amamentação até o segundo ano de vida ou mais. Iniciar a alimentação complementar precoce do bebê pode influenciar no tempo do AM e na absorção de nutrientes do LH, igualmente a alimentação tardia pode alterar o crescimento da criança, aumentando a possibilidade de desenvolver desnutrição e a falta de micronutrientes no organismo. Esta determinação ocorreu após uma revisão sistemática da literatura, sobre os benefícios da mesma para a mãe e filho. (NOGUEIRA, 2009; CORRÊA *et al*, 2009).

Segundo a Agência Nacional de Saúde (ANS) o LH contém mais de 250 componentes que são capazes de interações complexas com o recém-nascido, inclusive o pré-termo.

O Leite materno (LM) contém um hormônio chamado endorfina que é capaz suprimir a dor. Além disso, contém linfócitos e imunoglobulinas que protegem o bebê de infecções, com ênfase em diarreias e pneumonias. Contém leucócitos, anticorpos e alguns outros fatores que combatem a infecção protegendo assim da maioria dos vírus e bactérias. Ressaltando também que o leite de cada mãe contém anticorpos que protegem o bebê das doenças às quais ela foi exposta. (NOGUEIRA, 2009; OMS, 2003).

Ainda destaca-se como benefício para o bebê, menor incidência da síndrome da morte súbita, proteção das vias aéreas e do trato gastrointestinal contra doenças infecciosas, ganho de peso adequado, melhor resposta às vacinações, menor risco de desenvolver diabetes mellitus, câncer, obesidade, artrite juvenil, cegueira noturna e uma habilidade melhor em combater doenças (CORRÊA *et al*, 2009).

Um dado publicado em 2006 pela Pesquisa Nacional em Demografia e Saúde (PNDS) aponta que 95% das crianças com idade inferior a 60 meses, foram amamentadas, observando uma progressão especialmente na duração total do AM no Brasil. Demonstrou também que a prevalência do aleitamento materno exclusivo (AME) foi de 41% no conjunto de capitais brasileiras e Distrito Federal (DF), já o aleitamento materno em crianças de 9 a 12 meses foi de 58,7%. A situação melhorou em comparação a última pesquisa do MS, porém a situação do AME continua ruim e a duração do tempo de amamentação muito ruim, de acordo com a recomendação da OMS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, PNDS, 2009).

Com a evolução da espécie humana o LH modificou e adaptou-se às necessidades dos bebês, oferecendo assim exatamente o essencial para o seu desenvolvimento. O mesmo ocorre com o leite de outros mamíferos, inclusive o bovino, que com decorrer dos anos alterou-se oferecendo assim o ideal para o crescimento e amadurecimento do bezerro. De acordo com a idade gestacional do neonato o leite é adaptado fisiologicamente, para oferecer a alimentação ideal para cada fase do desenvolvimento, como por exemplo, o colostro (produzido até o 7º dia após a apojadura) contém um maior número de nutrientes para o recém-nascido, já o de transição (do 7º dia de apojadura até o 15º) contém uma quantidade menor, enquanto que o maduro permanece atendendo às necessidades do bebê até o seu primeiro ano de vida (MARINELLI e HAMELIN, 2007).

2.7 A importância dos AG no leite materno para os bebês pré-terms

Segundo Sabel *et al* (2009), muitos autores consideram o LH um padrão ouro na alimentação infantil. Por isso, devido a essa especificidade quando se compara o leite de vaca com o humano, existem várias diferenças extremamente relevante para a saúde do RN, tais como a deficiência AGE e a grande quantidade de proteínas com alto poder alergênico e que através de estudos científicos descobriram que predispõem ao ganho de peso e a obesidade (CAMPOS *et al*, 2008).

A maior fonte de energia para as crianças amamentadas com o leite materno provém dos lipídios, cerca de 40 a 55% de toda a energia ingerida, pois contêm nutrientes essenciais como vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI). Sabe-se há muitas décadas que os lipídios são essenciais para o crescimento infantil, por isso tem sido dada atenção especial aos compostos do LH (TINOCO, 2007).

A alimentação correta durante a infância é imprescindível para o crescimento adequado, função cognitiva e saúde da criança. Enquanto os bebês pré-terms apresentam maior probabilidade de desenvolver dificuldades escolares, problemas no desenvolvimento neurológico, maior percentual de morbidade e mortalidade, queixas psicológicas, transtorno de atenção/hiperatividade quando se compara com os RN's de termos. Além disso, o baixo peso ao nascer pode associar-se a doenças cardiovasculares e diabetes mellitus na vida adulta. Todas essas enfermidades podem estar relacionadas com o fornecimento de nutrientes na vida fetal e neonatal.

Por isso, sugestionam-se que a nutrição do prematuro seja idealizada para o crescimento e desenvolvimento conforme um feto normal da mesma idade pós-concepção (HENRIKSEN, 2008).

Porém após o nascimento o RN é inapto a sintetizar o AGPICL pela sua imaturidade, principalmente hepática, e é através do LM que o mesmo é oferecido (LIMA *et al*, 2004).

Visto que a concentração dos mesmos no LH diminui de acordo com a progressão da lactação e ponderando o fato que às vezes não é viável o consumo da quantidade adequada do DHA, EPA e AA, o interesse em suplementá-los aumentou. De acordo com a Associação Dietética Americana estes complementos podem ajudar os indivíduos quando a dieta é inadequada, principalmente quando se trata de população idosa, gestantes e aqueles com variedade limitada na escolha dos alimentos (OPPERMAN, 2011; IMHOFF-KUNSCH, 2010).

A nutrição rica em ômega-3 e 6 podem atuar em processos cognitivos do cérebro em humanos, e em alguns estudos observaram a auto regulação dos genes que são essenciais para manter a sinapse e a plasticidade dos cérebros de ratos. Além disso, notaram que a deficiência de DHA durante a gestação e após o nascimento destes roedores, favoreceu a ansiedade quando comparados com os animais com alimentação rica em DHA. Outro fator analisado foi que a ausência deste AGPICL pode levar a dificuldade natural do animal em enfrentar desafios (SHARMA, ZHUANG e GOMEZ-PINILLA, 2012).

Conquanto os estudos demonstrem os efeitos benéficos da suplementação, o excesso de consumo em pessoas saudáveis pode ser prejudicial, incluindo depressão da função imunológica, hemorragias, aumento do risco de acidente vascular cerebral hemorrágico e danos a vários tecidos causados pelo aumento da peroxidação lipídica. Uma comissão Européia composta por Fundação de Saúde da Criança, Grupo de Estudos de Diabetes Mellitus Gestacional, Associação Européia de Medicina Perinatal, Sociedade Européia de Nutrição Clínica e Metabolismo, Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição, Comitê de Nutrição, Federação Internacional de Associações de Placenta e Sociedade Internacional para o Estudo dos Ácidos Graxos e Lipídios, Esses órgãos de extrema competência realizaram uma extensa revisão para investigar evidências científicas dos benefícios do consumo dos AGE. E chegaram à conclusão que mulheres grávidas requerem no mínimo 200 mg de DHA diariamente. Estando

próxima a indicação da FDA (Food and Drug Administration) que determina o consumo máximo de até 300mg/dia de AGPICL é seguro (OPPERMAN, 2011; MORSE N.L., 2012).

O consumo de suplementos de ômega-3 pode ter efeitos colaterais em uma população muito restrita. Sugere-se que os diabéticos e indivíduos com intolerância a glicose usem com cautela, pois podem ocorrer efeitos prejudiciais na homeostase da glicose, e o aumento de hemorragias nasais também foi descrita em sujeitos com hipercolesterolemia. Além do mais, a ingestão de aspirina e varfarina com o ômega-3 pode prolongar o sangramento em usuários de anticoagulante (OPPERMAN, 2011).

A transferência de AGPICL ocorre principalmente no último trimestre de gestação, através da barreira placentária e nas primeiras semanas de vida. É porque nesta fase ocorre o desenvolvimento acelerado do tecido cerebral, com diferenciação celular, sinaptogênese ativa e crescimento do sistema vascular, podendo com isso aumentar o risco de hemorragia Peri-intraventricular. Esses AGE estão presentes com concentrações altas em todas as membranas celulares e na matéria cinzenta cerebral, realizando um importante papel nas células neuronais no SNC. Estudos recentes também demonstraram a importância do DHA para o desenvolvimento normal da célula glial. Destacando assim a necessidade especial desses AGE. Alguns estudiosos apontaram que os recém nascidos que tinham maior quantidade de DHA no plasma apresentaram a eletroencefalografia mais madura (SABEL, 2009; DAVIS-BRUNO and TASSINARI, 2011; INNIS and ELIAS, 2003).

Conforme esperado as maiores diminuições do DHA ocorre no córtex, hipocampo, cerebelo, corpo estriado, hipotálamo frontal e mesencéfalo. Outros dados apontam que a conservação da ingestão deste AGE é importante para manter a quantidade ideal nestas regiões cerebrais, assim sendo a insuficiência nestes locais é considerada significativa, com base na extrema importância de suas funções (DAVIS-BRUNO and TASSINARI, 2011).

Estudos realizados com ratos e suínos jovens apresentaram que a deficiência do ômega-3 altera a função da dopamina e da serotonina no cérebro. Pois estes hormônios têm papel fundamental nos progressos cognitivos na infância, atuando como modulador da atenção e motivação, assim como no sistema visual. Os efeitos dos AGPICL na retina são pesquisados principalmente em primatas, pois eles são

considerados os animais mais apropriados devido às peculiaridades únicas, bem como a retina central rica em cones fotorreceptores e uma fóvea especializada que é responsável pela acuidade visual elevada (DAVIS-BRUNO e TASSINARI, 2011).

Crianças prematuras são susceptíveis a déficit no desenvolvimento comportamental e de linguagem, com isso o desafio dos pesquisadores é melhorar os resultados cognitivos dos prematuros através de estudos com suplementação de DHA (AUESTAD *et al*, 2003).

Smithers *et al* (2010) em seu estudo não encontraram nenhuma diferença no desenvolvimento da linguagem e do comportamento dos pré-termos, utilizando o leite materno suplementado com DHA (1%), enquanto o outro grupo era composto com o LH no valor normal (0,3%). Em outra pesquisa Henriksen *et al* (2008) demonstraram que o LM complementado com DHA E AA apresentou aumento dos mesmos nos glóbulos vermelhos na idade neonatal. As crianças foram novamente avaliadas com a idade de seis meses, e o resultado foi que os bebês suplementados apresentaram habilidades melhores para resolução de problemas e reconhecimento de objetos familiares e não familiares, em comparação com o grupo controle. Estas informações são importantes para avaliar a atenção, aprendizagem e o processamento de informações destas crianças.

Smithers *et al* (2008) explicou que bebês prematuros alimentados por leite rico em DHA, com uma quantidade superior ao leite humano, apresentaram melhor acuidade visual em relação aos bebês nutridos com dose padrão.

Algumas desordens neuropsiquiátricas, tais como esquizofrenia, depressão e TDAH (Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade), estão associadas com a carência do AGPICL (DAVIS-BRUNO e TASSINARI, 2011).

Outro local onde esse AGE está presente em grande quantidade é nas membranas fotorreceptoras da retina, principalmente o DHA. Com isto testes da retina foram realizados em ratos privados de ômega-3 apresentaram amplitude reduzida no eletrorretinograma (ERG) e prejuízo na discriminação da habilidade visual (DAVIS-BRUNO e TASSINARI, 2011).

Escala de desenvolvimento e teste neurofisiológico são exames utilizados recentemente por pesquisadores para avaliar a finalidade da suplementação do DHA. O teste pode observar a função sensória motora, enquanto a escala examina o domínio neural e marcos do desenvolvimento motor, sendo este importante para avaliar a evolução e o crescimento infantil (AGOSTONI *et al*, 2009).

A concentração de DHA no LH é estável durante o primeiro ano de vida, sendo equivalente a 0,5% no colostro e 0,25% no leite maduro, este último de características próprias como diferentes concentrações de nutrientes em uma mesma mamada, caracterizando a saída dos lipídios no final do leite (leite posterior). Esta oferta para o RN foi calculada em torno de 50mg/Kg/dia para o ω 3 e 400mg/Kg/dia para o ômega-6. De acordo com o consenso da Associação Mundial de Medicina Perinatal, a Academia de Nutrição Precoce e a Fundação de Saúde da Criança realizada no ano de 2007 determinaram que a quantidade ideal para adicionar DHA e AA em fórmulas infantis é de 0,2%, enquanto que o DHA não deveria exceder 0,5% do total de AG, pois não havia estudos anteriores que comprovassem a segurança ao exceder essa quantidade. Porém Birch *et al* (2010) conduziram um estudo e acrescentaram até 0,96% de DHA na fórmula com segurança, pois este valor está dentro da variação encontrada no LH. Chegaram à conclusão que a variação ideal seria de 0,32% a 0,64% (SABEL, 2009; AGOSTINI, 2008).

Existe uma importante argumentação sobre a baixa ingestão de ômega-3 e a sua contribuição para o parto prematuro. Sabel (2009) relatou em seu estudo que a baixa ingestão de gordura insaturada durante a gravidez afeta negativamente a oferta de AGE para o feto e para o RN, não sendo possível essa recuperação tardiamente e em decorrência trazendo consequências negativas na saúde futura desta criança.

Submeter ratos à restrição de AGPICL pode prejudicar a função em distinguir o brilho, o olfato e a habituação baseados na aprendizagem. A privação dos mesmos AG em macacos alterou o interesse em procurar uma nova tarefa, aumentou o comportamento estereotipado e levou a polidipsia (NG e INNIS, 2003).

Não foi totalmente esclarecido se todos os requisitos dos bebês prematuros são sanados pelo LM, pois alguns estudiosos relatam que não há diferença na concentração dos AGE no leite das mães de prematuro em relação às mães de termo, entretanto outros autores relatam o controverso (SABEL, 2009).

Granot (2011) relatou que crianças amamentadas têm um percentual duas vezes maior de DHA em comparação com os bebês que são alimentados com fórmula não suplementadas.

Porém alguns fatores podem determinar a quantidade de DHA oferecido ao feto durante a gestação e no LM. Como por exemplo, a dieta materna, idade

gestacional, paridade e fumo. Estudiosos observaram que os filhos de mães fumantes apresentam uma quantidade menor de DHA do que os filhos de mães não fumantes, em parte explica-se a associação do tabagismo materno com a deficiência do crescimento e do desenvolvimento do lactente. Outro elemento que possivelmente pode interferir no metabolismo destes AGPCL é a presença de quantidade elevada do ácido graxo *trans* (AGT), podendo prejudicar o crescimento intrauterino através da inibição da biossíntese dos AGE, esta opinião é amparada por estudiosos que demonstraram que os mesmos são contrariamente relacionados com o peso do nascimento (SILVA, 2007; AGOSTINI, 2008; FRIESEN e INNIS, 2006).

Este conceito é defendido porque o DHA exerce um papel essencial no processo de crescimento do bebê, já que está coligado com a estatura, peso e circunferência cranial do nascimento. Estudos realizados na Holanda demonstraram que o baixo peso ao nascer e menor perímetro cefálico está relacionado com a apresentação de AGT no cordão umbilical e baixa quantidade de AGE. Embora todas essas informações sejam relevantes, não há conclusão sobre os efeitos deletérios dos AGT na criança, a indicação atual é regular o uso devido à probabilidade de efeitos adversos (TINOCO, 2007).

Durante o momento de alta demanda nutricional, sendo este a gravidez e a lactação, o nível de AGE tende a declinar porque a exigência nutricional é alta, pois há formação tecidual do feto durante a gestação e a produção do leite. Além disso, a quantidade de DHA em múltiparas é menor se comparar com as primíparas. Diante desses fatos e do aumento da procura desse AG, recomenda-se a suplementação do DHA (GRANOT, 2011; TORRES, 2009).

Em diferentes países foi evidenciado que, o uso de suplementos dietéticos com DHA na gestação aumentou o nível do mesmo na mãe. Logo após o início da amamentação as concentrações destes AGE diminuem continuamente. Todavia não exista recomendação oficial para a utilização do DHA durante a gravidez e o aleitamento, a ingestão não deve ultrapassar de 300mg/dia (BERGMAN *et al*, 2008; IMHOOF-KUNSCH, 2010).

O AA é considerado fundamental para o desenvolvimento normal, sendo também de extrema importância no encargo de sinalização e divisão celular, e como predecessor dos eicosanóides da série 2 e leucotrienos da série 3, os quais também executam função na sinapse (TINOCO, 2007).

Pesquisas atuais apontam que o DHA corresponde por mais de um terço dos AG totais presentes na retina e na massa cinzenta do cérebro, acumulando-se principalmente no terceiro trimestre de gestação e até o período pós-natal, porém no prematuro este fornecimento é interrompido e a criança depende exclusivamente do LM, quando o mesmo é possível ser fornecido. A deficiência do DHA apresentou níveis reduzidos no eritrócito e nos tecidos cerebrais e da retina, resultando em anormalidades na função retiniana que podem ser irreversíveis (LIMA *et al*, 2004; MARINELLI e HAMELIN, 2007).

Conforme descrito por Morales *et al* (2011) o DHA desempenha uma importante função na sinapse e na plasticidade no momento do desenvolvimento inicial do tecido cerebral. O desequilíbrio deste AG pode ser relacionado com distúrbios neuropsiquiátricos na fase infantil. Neste mesmo estudo demonstrou que as mães que tinham uma concentração maior de DHA no organismo, apresentaram uma vantagem real na parte cognitiva da criança com idade de 14 meses.

Com isto altas concentrações de DHA na massa cinzenta do cérebro e na retina sugerem a tamanha importância da função destes AGPCL no processo visual e neural (SILVA, 2007; LIMA *et al*, 2004; AGOSTINI, 2008; SABEL, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

3.1 Comparar a quantidade de DHA, EPA e AA no leite da mãe do RN pré-termo e da mãe do RN a termo.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 - Conhecer e comparar a quantidade do DHA, EPA e AA no leite da mãe do RN pré-termo e da mãe do RN a termo durante as três fases de lactação (colostro, transição e maduro).

3.2.2 - Identificar as quantidades de DHA, EPA e AA nos leites das mães do RN pré-termo e das mães do RN a termo, e comparar as concentrações entre os grupos.

4. MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de um estudo do tipo ensaio clínico, realizado no hospital universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) no período de março de 2010 a março de 2012.

4.1. População

Foram convidadas a participar da pesquisa 136 lactantes por meio do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme os critérios de inclusão.

4.2. Critérios de Inclusão

- Mães que tiveram seus filhos prematuros (< 37 semanas de gestação) ou termo (≥ 38 semanas de gestação) no Hospital universitário Maria Aparecida e estavam no período de lactação e que contemplava as 3 fases, sendo estas: a fase do colostro (até o 7º dia após o parto com característica de colostro), a de transição (do 7º dia até o 15º após o parto, com característica de leite de transição) e a fase do leite maduro após o 15º dia após o parto e que permanece atendendo as necessidades do bebê até o fim do aleitamento. E que concordaram em doar 5 ml do leite ordenhado e retirado todo o conteúdo de uma mama e aceitaram responder a ficha cadastral com dados contendo: hábitos de vida, variáveis clínicas e condições do RN.

4.3. Critérios de não Inclusão

- Mães que possuem contraindicações para o aleitamento materno, como por exemplo, portadora do vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1 e 2), população indígena e quilombola, mulheres que utilizaram medicamentos não compatíveis com a amamentação e drogas ilícitas.
- Mães que não tinham características da produção láctea que pudesse ser classificada nas 3 fases distintas de lactação.

4.4. Critérios de Exclusão

- Foram excluídas 86 lactantes que desistiram de participar das 3 fases da coleta e 03 lactantes que desistiram da coleta por óbito do recém-nascido.

4.5. Amostras de leite

A técnica foi realizada de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que tem por preferência a técnica manual, pois possui benefícios econômicos, é menos traumático, menos doloroso, é a forma mais efetiva, além de reduzir significativamente os possíveis riscos de contaminação. A pressão desempenhada na mesma foi feita delicadamente para posterior retirada do leite. A manipulação foi realizada por um profissional de saúde ou pela própria nutriz sob supervisão. A coleta foi realizada no banco de leite humano do NHU, seguindo as normas de higiene e padronização para coleta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Os utensílios foram previamente esterilizados em autoclave para a coleta do leite. Ao final o mesmo foi acrescentado a um frasco de vidro devidamente esterilizado em autoclave, vedado, identificado e levado diretamente ao congelador (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A estocagem do leite seguiu as normas da ANVISA, sendo em um *freezer* localizado distante de fonte calor, sem luz solar diretamente no mesmo e a 20 cm da parede ou de qualquer outro equipamento. O período máximo de armazenamento foi de 15 dias e submetido a uma temperatura máxima de -20°C , com controle diário da temperatura máxima e mínima dos produtos estocados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A ordenha foi realizada da mama da nutriz até a saída do leite posterior (refere-se ao leite extraído ao final da mamada que é mais rico em lipídios) (MARINELLI, HAMELIN, 2007), e a amostra para a pesquisa foi de 5 ml do leite cru e homogeneizado.

4.6. Determinação laboratorial

As análises laboratoriais, para a determinação da composição lipídica das amostras de leite e o preparo das mesmas para serem cromatografadas, foram

realizadas nos Laboratórios do Departamento de Tecnologia Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS).

4.7. Extração e preparo da amostra para quantificação de DHA, EPA e AA

Para a determinação do DHA, EPA e o AA no leite materno (substrato) utilizou-se o método de Lepage, Roy (transesterificação direta dos lipídios) (LEPAGE, ROY, 1986).

As amostras de leite congeladas foram aquecidas a 40°C, logo após foram homogeneizadas e esfriadas a 20°C, em tubo de ensaio com tampa de rosca e septo de teflon número cinco, adicionou-se alíquota de 0,1ml de LH homogeneizado.

Acrescentou-se 2 ml de mistura de benzeno-metanol (1:4), após o tubo foi tampado e agitado. A seguir adicionaram-se 0,2 ml de cloreto de acetila. Na sequência o tubo foi tampado e colocado em banho de água a 100° C por 60 minutos. Após o esfriamento adicionou-se 5 ml de carbonato de potássio a 6%. Em seguida foi agitado e centrifugado a 3.500 rpm por 10 minutos. Logo após retirou-se a fase superior, secou-se sob nitrogênio e ressuspendeu-se com 300 µl de diclorometano contendo 100 ng/µl de C23:0 (padrão interno) e foi adicionado a um vial para a realização da cromatografia gasosa.



Figura 3: Aparelho de Banho-maria

Fonte: Merey, 2014.

4.8. Cromatografia gasosa

A determinação da composição lipídica (DHA + EPA + AA) presente nas amostras de LM foi realizada através da cromatografia gasosa, no laboratório de bicomcombustível do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Os ésteres metílicos dos AG obtidos foram analisados em cromatógrafo gasoso (Shimadzu, modelo GC- 2010) com detector de ionização de chama, injetor ‘Split/Splitless’ coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de polietilenoglicol (Carbowax 20M, 30 m x 0,25 mm, Quadrex) seguindo, em princípio, as seguintes condições cromatográficas: temperatura do injetor 250°C; temperatura do forno 80°C durante 3 minutos programado para aquecimento a 10°C por minuto até 120°C seguido de aquecimento a 3°C até 240°C, gás de arraste hélio com fluxo de 1 ml/min. e volume da injeção 1µl.

Para identificação dos AG foram comparados os respectivos tempos de retenção com os dos padrões de ésteres metílicos (SUPELCO, F.A.M.E. mix C 12:0 a C24:0, Sigma-Aldrich), quantificando-os através da normalização de área e expressando os resultados em percentual de área de cada AG em relação a área total destes.



Figura 4: Cromatógrafo

Fonte: Merey, 2014.



Figura 5: coluna cromatográfica

Fonte: Merrey, 2014

4.9. Análise Estatística

Para comparar proporções de gestantes entre as variáveis do estudo foram utilizados os testes Qui-quadrado, Qui-quadrado de tendência e Teste Exato de Fisher. A comparação entre os valores médios do DHA, EPA e AA do LH dos RN's prematuros e termos foi feita pelo Teste Mann Whitney e entre as fases do leite 1 (colostro), 2 (transição) e 3 (maduro) foi feita pelo Teste Kruskal Wallis. O nível de significância adotado foi de 5%. Foram utilizados os Programas de computador BioEstat versão 5 e Epi Info 3.5.3 (AYRES *et al.*, 2007; CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION, 2011).

4.10. Considerações éticas

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e a autorização para fazer parte do estudo foi através do termo de consentimento livre esclarecido assinado conforme APENDICE I.

5. RESULTADOS

Ao analisar os dados expostos na Tabela 1 observa-se que não houve diferença ($p>0,05$) na proporção de gestantes que tiveram recém-nascidos prematuros (grupo prematuro - GP) e termos (grupo termo - GT) em relação às seguintes variáveis: faixa etária, naturalidade, município de residência ou atividade profissional.

Tabela 1 – Número e porcentagem de gestantes segundo variáveis de identificação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – 2016.

Variáveis	Prematuro (GP) (n=23)		Termo (GT) (n=24)		⁽¹⁾ p
	Nº.	%	Nº.	%	
Faixa etária					0,554
Até 20 anos	8	34,8	5	20,8	
De 21 a 35 anos	13	56,5	16	66,7	
De 36 a 45 anos	2	8,7	3	12,5	
Naturalidade					0,077
Campo Grande -MS	9	39,1	7	29,2	
Interior de MS	13	56,5	10	41,6	
Outros estados	1	4,4	7	29,2	
Residência					0,916
Campo Grande -MS	15	65,2	16	66,7	
Interior de MS	8	34,8	8	33,3	
Atividade profissional					0,675
Sim	12	52,2	11	45,8	
Não, do lar	9	39,1	12	50,0	
Não, estudante	2	8,7	1	4,2	

⁽¹⁾ Teste Qui-quadrado.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados referentes ao número e porcentagem de gestantes de acordo com os hábitos de vida, variáveis clínicas e a condição do recém-nascido. Não houve diferença ($p>0,05$) na porcentagem de gestantes que tiveram recém-nascidos prematuros ou termos em relação ao etilismo, tabagismo, consumo de peixe e gordura trans, realização de pré-natal, sorologia e quantidade de gestações, partos e abortos.

Tabela 2 – Número e porcentagem de gestantes segundo hábitos e variáveis clínicas das gestantes, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – 2016.

Variáveis	Prematuro (GP) (n=23)		Termo (GT) (n=24)		p
	Nº.	%	Nº.	%	
Etilismo					(1) 1,000
Sem informação	2	8,7	-	-	
Sim	2	8,7	3	12,5	
Não	19	82,6	21	87,5	
Tabagismo					(1) 0,212
Sem informação	2	8,7	-	-	
Sim	2	8,7	-	-	
Não	19	82,6	24	100,0	
Consumo de peixe					(2) 0,593
Sem informação	4	17,4	6	25,0	
3 a 8 vezes por mês	4	17,4	2	8,4	
1 a 2 vezes por mês	10	43,5	11	45,8	
1 a 6 vezes por ano	5	21,7	5	20,8	
Consumo de gordura trans					(1) 0,477
Sem informação	2	8,7	1	4,2	
Sim	20	86,9	23	95,8	
Não	1	4,4	-	-	
Pré natal					(1) 0,097
Não ou irregularmente	5	21,7	1	4,2	
Sim	18	78,3	23	95,8	
Sorologia					-
Sem informação	1	4,4	-	-	
Negativa	22	95,6	24	100,0	
Quantidade de gestações					(2) 0,503
Sem informação	2	8,7	2	8,3	
Uma	9	39,1	12	50,0	
Duas	5	21,8	4	16,7	
Três ou mais	7	30,4	6	25,0	
Quantidade de partos					(2) 0,758
Sem informação	2	8,7	2	8,3	
Uma	11	47,7	13	54,2	
Duas	5	21,8	4	16,7	
Três ou mais	5	21,8	5	20,8	
Quantidade de abortos					(2) 0,857
Sem informação	2	8,7	2	8,3	
Nenhum	16	69,6	17	70,8	
Um	4	17,4	3	12,5	
Dois	1	4,4	2	8,3	

Nota: a categoria “sem informação”, quando presente, foi suprimida do cálculo do teste estatístico.

(1) Teste de Fisher.

(2) Teste Qui-quadrado de tendência.

Os resultados apresentados e ilustrados na Tabela 3 demonstram que não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos de gestantes que tiveram recém-nascidos

prematuros ou termos ao comparar as seguintes variáveis: uso ou não de drogas e quantidade de medicamentos. As drogas mais utilizadas pelas gestantes de recém-nascidos prematuros foram: metildopa, cefalexina, nifedipina e miconazol, e no grupo das gestantes de recém-nascidos termos foram: cefalexina, metiformina e metronidazol.

Tabela 3 – Número e porcentagem de gestantes segundo o uso de drogas durante a gestação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – 2016.

Variáveis	Prematuro (GP) (n=23)		Termo (GT) (n=24)		p
	Nº.	%	Nº.	%	
	Droga				
Sem informação	2	8,7	-	-	
Sim	15	65,2	12	50,0	
Não	6	26,1	12	50,0	
Quantidade de drogas (2)					(2) 0,438
Não se aplica	8	34,8	12	50,0	
Uma	8	34,8	7	29,2	
Duas	3	13,0	4	16,6	
Três	4	17,4	1	4,2	
Tipo de droga(3)					-
Não se aplica	8	34,8	12	50,0	
Metildopa	6	26,1	-	-	
Cefalexina	5	21,7	6	25,0	
Nifedipina	3	13,0	-	-	
Miconazol	2	8,7	-	-	
Corticosteróide	1	4,4	-	-	
Azitromicina	1	4,4	-	-	
Dactil	1	4,4	-	-	
Buscopan	1	4,4	-	-	
Amoxicilina	1	4,4	1	4,2	
Dipirona	1	4,4	1	4,2	
Floxican	1	4,4	-	-	
Dorflex	1	4,4	-	-	
Yasmin	1	4,4	-	-	
Fluoxetina	1	4,4	-	-	
Insulina	1	4,4	1	4,2	
Pindolal	1	4,4	-	-	
Hidralazina	1	4,4	-	-	
Neozina	1	4,4	-	-	
Clexane	1	4,4	-	-	
Uterogesten	-	-	1	4,2	
Celestone	-	-	1	4,2	
Hioscina	-	-	1	4,2	
Metiformina	-	-	2	8,3	
Metronidazol	-	-	2	8,3	
Pomada para ITU	-	-	1	4,2	
Tromboprolifaxia	-	-	1	4,2	
Fragmin	-	-	1	4,2	

Nota: as categorias “sem informação” e “não se aplica”, quando presentes, foram suprimidas do cálculo do teste estatístico.

(1) Teste de Qui-quadrado.

(2) Teste Qui-quadrado de tendência.

(3) 1 ou mais drogas por gestante.

As intercorrências durante a gestação e no parto foram mais frequentes ($p < 0,001$) nas gestantes de recém-nascidos prematuros (91,3%) em comparação com as do grupo termo (50%).

As intercorrências mais frequentes nas gestantes de recém-nascidos prematuros foram: infecção do trato urinário, pré-eclâmpsia e HAS, e nas gestantes de recém-nascidos termos foram: infecção do trato urinário e DMG (Tabela 4).

Tabela 4 – Número e porcentagem de gestantes segundo a ocorrência de intercorrência na gestação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – 2016

Variáveis	Prematuro (GP) (n=23)		Termo (GT) (n=24)		⁽¹⁾ p
	Nº.	%	Nº.	%	
Tipo de intercorrência ⁽²⁾					-
Não se aplica	2	8,7	12	50,0	
ITU	8	34,8	5	20,8	
Pré-eclampsia	4	17,4	1	4,2	
HAS	3	13,0	1	4,2	
Descolamento de placenta	2	8,7	-	-	
DMG	2	8,7	3	12,5	
DHEG	1	4,4	-	-	
Diabetes tipo I	1	4,4	-	-	
Eclâmpsia	1	4,4	-	-	
Hipotireoidismo	1	4,4	-	-	
Incompetência istimo-cervical	1	4,4	-	-	
Sangramento por 6 dias	1	4,4	-	-	
Centralização fetal	1	4,4	-	-	
Leucorréia	1	4,4	-	-	
Mãe com eas infeccioso	1	4,4	-	-	
Oligoamnio	1	4,4	1	4,2	
Centralização de fluxo	1	4,4	-	-	
Candidíase	1	4,4	-	-	
Trab parto prematuro c/ urocultura c/ strepto b+/bolsa rota de 4 dias	1	4,4	-	-	
Afinamento colo útero	-	-	1	4,2	
Bacteriúria fim da gestação	-	-	1	4,2	
Corrimento no 1º trimestre	-	-	1	4,2	
Isoimunização rh	-	-	1	4,2	
Condiloma	-	-	1	4,2	
DPP (sangramento em gd quantidade)	-	-	1	4,2	
Gardnerella	-	-	1	4,2	

Nota: categoria "sem informação" foi suprimida do cálculo do teste estatístico.

⁽¹⁾ Teste de Qui-quadrado.

⁽²⁾ 1 ou mais intercorrências por gestante.

Os resultados ilustrados na Tabela 5 demonstram que a média do ácido graxo AA2 (leite de transição) foi menor no leite de mães de recém-nascidos prematuros ao comparar-se com os de termo ($p < 0,014$). Ao realizar a comparação da concentração dos ácidos graxos DHA, EPA e AA nas três fases de leite: colostro, transição e maduro não houve diferença ($p < 0,05$) entre as fases.

Tabela 5 – Média e desvio padrão (DP) da concentração do DHA, EPA e AA nas 3 fases do leite no GP e GT, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – 2016

Variáveis	Prematuro (GP) (n=23)		Termo (GT) (n=24)		⁽¹⁾ <i>p</i>
	Média	DP	Média	DP	
DHA1 colostro	0,23	0,16	0,25	0,22	0,604
DHA2 transição	0,09	0,08	0,14	0,06	0,203
DHA3 maduro	0,16	0,10	0,14	0,09	0,594
p	⁽²⁾ 0,331		⁽²⁾ 0,698		
EPA 1 colostro	0,81	1,40	0,93	0,78	0,144
EPA 2 transição	0,33	0,27	0,90	0,73	0,074
EPA 3 maduro	0,35	0,41	0,75	0,67	0,161
p	⁽²⁾ 0,865		⁽²⁾ 0,933		
AA 1 colostro	0,28	0,34	0,23	0,13	0,936
AA 2 transição	0,06	-	0,33	0,18	0,014
AA 3 maduro	0,12	0,03	0,28	0,14	
p	⁽¹⁾ 0,093		⁽²⁾ 0,468		

⁽¹⁾ Teste Mann Whitney

⁽²⁾ Teste Kruskal Wallis

6. DISCUSSÃO

Pesquisas atuais apontam que a alimentação materna a curto e em longo prazo e as fases da lactação influem diretamente na composição do LH. Neste estudo observou-se que a frequência de consumo do peixe das mães durante a gestação e na amamentação é baixo, se comparado com a alimentação da população da região costeira. E a ingestão de AGT foi alta. Pesquisadores defendem a hipótese de que a ingestão do AGT dificulta a biossíntese do AA e DHA, relacionando-se assim diretamente com o baixo peso ao nascer, tanto em partos prematuros quanto os de termo, menor perímetro cefálico e retardo no desenvolvimento (KELISHADI *et al*, 2012).

A variação da concentração de DHA deste estudo no leite maduro das mães foi $0,14 \pm 0,25$ (DHA3) e AA3 $0,23 \pm 0,33$, cujos valores observados por BRENNAN (2007) estão dentro dos padrões segundo estudo realizado em 106 países com $0,22 \pm 0,32$ (DHA) e $0,13 \pm 0,47$ (AA) respectivamente. Os países com maior concentração de DHA são: Ártico canadense, Japão, República Dominicana, Filipinas e Congo apresentaram valores médios $0,6 \pm 1,4$, e os que obtiveram menor concentração foram: Paquistão, área rural da África do Sul, Canadá, Holanda e França ($0,06 \pm 0,14$). Estes locais com baixa porcentagem de DHA estão geralmente associados à baixa ingestão de alimentos marinhos (BRENNAN *et al*, 2007).

Uma pesquisa semelhante realizada no Irã comparou a quantidade do AA e o DHA no leite maduro, e a quantidade de AA3 encontrada do grupo pré-termo (GP) foi de $0,10 \pm 0,19$ e no grupo de termo (GT) $0,09 \pm 0,16$, enquanto que a média deste estudo foi de $0,12$ (GP) e $0,28$ (GT) respectivamente. Ao confrontar os níveis de AA observamos que nossos valores foram semelhantes em relação ao GP, porém o GT do presente estudo apresentou concentrações maiores do AA3. O mesmo pode-se ressaltar sobre o DHA, a porcentagem do GP foi $0,06 \pm 0,10$ e o GT foi $0,05 \pm 0,08$ dados estes que ficaram abaixo da média encontrada na concentração de DHA3 neste estudo: $0,16$ (GP) e $0,14$ (GT) (IRANPOUR, KELISHADI, BABAIE, KHOSRAVI-DARANI e FARAJIAN, 2013).

Nishimura *et al* (2013) realizaram a dosagem de AGPICL no LH maduro do RN de termo e observaram as seguintes médias inferiores as encontradas neste estudo (EPA3: $0,08$, DHA3 $0,09$) apenas o AA3 ($0,48$) foi superior no presente estudo.

Vale destacar que ambos os estudos foram realizados em regiões distantes da costa litorânea no Brasil, onde o consumo de alimentos ricos em AGE é habitualmente menor. A quantidade recomendada de consumo de DHA é 200-300mg/dia (OMS, 2003). Para atingir esta recomendação é necessária a ingestão diária de 43g de peixe rico em ômega 3, como por exemplo: atum, sardinha, salmão, truta e bacalhau. Em uma pesquisa de análise do consumo alimentar no Brasil (POF 2008-2009/IBGE 2011) observou-se que a ingestão média de peixe nas mulheres em idade fértil ficou bem abaixo do recomendado (24,1g/dia) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Foi referido que o teor de DHA no leite maduro de mulheres adultas que residem no litoral do Rio de Janeiro foi de 0,22 e de AA 0,35, ambos ligeiramente acima dos valores encontrados neste estudo, porém a quantidade de EPA foi abaixo dos valores da presente pesquisa (TORRES e TRUGO, 2009). Meseses *et al* (2008) conduziu um estudo na mesma região para determinar quantidade dos mesmos AGPICL descritos acima no leite maduro de mães adolescentes. Com as seguintes médias: DHA 0,20, EPA 0,05 e AA 0,40, somente o EPA teve uma menor média ao se comparar com o atual estudo.

Os teores AGPICL deste estudo estão próximos, se não maiores, dos apresentados em outras pesquisas, apesar de não estar em uma localização favorável para o consumo de alimentos marinhos conforme descrito anteriormente. Existem outras fontes de ômega 3 e 6, como por exemplo, alguns frutos oleaginosos, sementes, vegetais, gema de ovo e carnes de ruminantes. Sabendo que o consumo deste tipo de carne e ovo é grande nesta região do presente estudo explica-se a quantidade destes AG dentro do padrão desejado pela OMS (TINOCO, 2007; ABEDI e SAHARI, 2014).

Alguns fatores contribuem para a alteração da composição lipídica no LH, sendo esses: paridade, dieta materna, classe socioeconômica, infecções e alterações metabólicas. Além disso, o alto consumo de AGT dificulta a formação dos AGPICL, que está associado com a pré-eclâmpsia, infarto do miocárdio, contração uterina e parto prematuro. Neste estudo grande parte das participantes relataram consumo demasiado de AGT, o que pode ter influenciado diretamente no teor de ômega 3 e 6 (TINOCO, 2007; SILVA, JUNIOR e SOARES, 2007).

Uma recente pesquisa realizada nos Estados Unidos da América (EUA) dosaram a quantidade de AGPICL no leite maduro das mães de prematuros, e a

média encontrada de DHA (0,28) e AA (0,61) foi maior que no presente estudo, porém o EPA (0,05) foi consideravelmente inferior. E em relação ao consumo de DHA, 40,6% das lactantes descreveram o consumo nas últimas 12 semanas de gestação, enquanto que na nossa pesquisa 43,5% relataram a ingestão de peixe (até 2 vezes ao mês). Sabe-se que a suplementação pode elevar consideravelmente os níveis de DHA no LH, conforme foi demonstrado no estudo de Gaete *et al* (2003) que aumentou 46.6% da quantidade do mesmo (BERSETH, HARRIS, WAMPLER, HOFFMAN e DIERSEN-SCHADE, 2014).

Appolinário (2011) descreveu a importância da ingestão de suplementos ou alimentos que contenham DHA, pois alguns estudos em humanos demonstraram que aproximadamente 5% do ALA é convertido em EPA e apenas 0,5% é convertido em DHA, o que justifica a baixa concentração de DHA em todas as fases do leite em ambos os grupos da presente pesquisa, pois a ingestão de peixe foi consideravelmente baixa de acordo com a recomendação da OMS (OMS, 2003).

Inicialmente a ideia do estudo era com um número maior de participantes, mas as dificuldades encontradas foram inúmeras como, por exemplo: desistência por mudança de cidade, endereço e telefone de contato, óbito do recém-nascido e a não aceitação em doar o leite em todas as fases, principalmente na última fase que é o leite maduro, a porcentagem de desistência foi de 65%. Apesar de todas as limitações respondeu-se ao objetivo geral do estudo e acredita-se que um novo estudo com uma amostra maior poderá apresentar resultados com estatísticas mais significativas.

Ao concluir observa-se que ao comparar as concentrações de AGPICL nas 3 fases do leite em ambos os grupos (GP e GT) e apesar dos valores estarem acima das quantidades demonstradas em outros estudos em cidades brasileiras, ainda permanece abaixo dos valores ideais recomendados pela OMS e para que isso ocorra, há necessidade de aumentar a ingestão de alimentos ricos em ômega 3 e 6 e diminuir o consumo de AGT. A importância da melhoria da alimentação é essencial não só objetivando aumentar esses índices no LH, e sim a evolução nos hábitos alimentares e seu impacto positivo na saúde pública (OMS, 2013).

7. CONCLUSÃO

Não houve diferença estatística ao se comparar a quantidade de DHA, EPA e AA no leite em todas as fases do GP e o GT, apenas o leite de transição do GT apresentou maior quantidade do AA.

8. REFERÊNCIAS

- ABEDI E.; SAHARI M. A. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. **Food Science & Nutrition**. v. 2, p. 443–463, 2014.
- ADARME-VEGA *et al.* Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. Australia, **Micr Cell Fact**. v.11, p.96, 2012.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos/ Brasília, 2008, p 1-160.
- AGOSTINI C. Role of Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids in the First Year of Life. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** v. 47, n. 2, p. 41-44, 2008.
- AGOSTONI *et al.* Docosahexaenoic acid supplementation and time at achievement of gross motor milestone in healthy infants: a randomized, prospective, double-blind, placebo-controlled trial. Itália, **Am. J. Clin. Nutr.** v. 89, p. 64-70, 2009.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 115, n. 2, p. 496-506, 2005.
- APPOLINÁRIO P.P.; DEROGIS P.B.M.C.; YAMAGUTI T.H.; MIYAMOTO S. Metabolism, oxidation and biological implications of docosahexaenoic acid in neurodegenerative diseases. **Química Nova**. v. 34, p. 1409-16, 2011.
- AUESTAD N. *et al.* Visual, cognitive, and language assessments at 39 months: A follow-up study children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. **Pediatrics**, Washington, v. 112, p.177-183, 2003.
- AYRES M.; AYRES Jr. M.; AYRES D.L.; SANTOS A.A.S. BioEstat. Aplicações estatísticas das Ciências Bio-médicas [programa de computador]. Versão 5.0. Belém (PA): Sociedade Mamirauá, 2007.
- BERGMAN R. L. Supplementation with 200mg/Ddy docosahexaenoic acid from mid-pregnancy through lactation improves the docosahexaenoic acid status of mothers with a habitually low fish intake and of their infants. **Ann. Nutr. Metab.** Alemanha, v. 52, p.157-166, 2008.
- BERSETH C.L.; HARRIS C.L.; WAMPLER J.L.; HOFFMAN D.R.; DIERSEN-SCHADE D.A. Liquid human milk fortifier significantly improves docosahexaenoic and arachidonic acid status in preterm infants. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 91, p. 97-103, 2014.
- BIRCH *et al.* The DIAMOND (DHA intake and measurement of neural development) Study: a double-masked, randomized controlled clinical trial of the maturation of infant visual acuity as a function of the dietary level of docosahexaenoic acid. **Am. J. Clin. Nutr.**, EUA, v. 91, p. 848-859, 2010.

BRENNAN J. T.; VARAMINI B. *et al.* Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. **Am J Clin Nutr**, 85, 1457–64, 2007.

CAMPOS, L. A. *et al.* Fórmulas para lactentes: repercussões na qualidade da nutrição e saúde infantil. **Rev. Pediatr.**, Fortaleza, v. 9, n. 2, p. 59-65, jul./ dez. 2008.

CORRÊA E. N. *et al.* Alimentação complementar e características maternas de crianças menores de dois anos de idade em Florianópolis (SC). **Rev Paul Pediatr**. v. 27, n. 3, p. 258-64, fev. 2009.

CHEMELLO R. M. L. Influência do aleitamento materno na colonização mucocutânea pelo *Staphylococcus Aureus* na criança com dermatite atópica. [Dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

DAVIS-BRUNO K.; TASSINARI M.S. Essential fatty acid supplementation of DHA and ARA and effects on neurodevelopment across animal species: A review of the literature. *Birth Defects Research (part B)*, p. 240-250, 2011.

DIVISION OF PUBLIC HEALTH SURVEILLANCE AND INFORMATICS. **Epi Info, versão 3.5.3, 26 janeiro 2011**. Disponível em <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 01 fev. 2011.

DOHERTY T. *et al.* Early cessation of breastfeeding amongst women in South Africa: an area needing urgent attention to improve child health. *África do Sul*, **BMC Pediatrics**. v. 12, p. 105, 2012.

FRIESEN R.; INNIS S.M. *Trans* fatty acids in human milk in Canada declined with the introduction of *trans* fat food labeling. Canada, **J. Nutr**. v. 136, p. 2558-2561, 2006.

GAETE M.G.; ATALAH E.S. Niveles de LC-PUFA n-3 en leche materna después de incentivar el consumo de alimentos marinos. **Rev Chil Pediatr**. v.74, p: 158-65, 2003.

GARNEAU V. *et al.* Omega-3 fatty acid status in human subjects estimated using a food frequency questionnaire and plasma phospholipids levels. Canada, **Nutr J**. v. 11, p. 46, 2012.

GRANOT E. *et al.* DHA Supplementation during Pregnancy and Lactation Affects Infants' Cellular but Not Humoral Immune Response. **Mediators of Inflammation**. v. 2011, article 493925, 2011.

HACIOGLU G. *et al.* Docosahexaenoic acid provides protective mechanism in bilaterally MPTP-lesioned rat model of Parkinson's disease. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v. 50, p. 228-238, 2012.

HENRIKSEN C. *et al.* Improved cognitive development among preterm infants attributable to early supplementation of human milk with docosahexaenoic acid and arachidonic acid. **Pediatrics**. Noruega, v. 121, p.1137-1145, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (Brasil). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

INNIS S. M.; ELIAS S. L. Intakes of essential n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids among pregnant Canadian Women. **Am. J. Clin. Nutr. Canada**, v. 77, p. 473-478, 2003.

IMHOFF-KUNSCH B. *et al.* Docosahexaenoic acid supplementation from mid-pregnancy to parturition influenced breast milk fatty acid concentrations at 1 month postpartum in Mexican women. **J. Nutr. México**, v. 141, p. 321-326, 2011.

IRANPOUR R.; KELISHADI R.; BABAIE S.; KHOSRAVI-DARANI K.; FARAJIAN S. Comparison of long chain polyunsaturated fatty acid content in human milk in preterm and term deliveries and its correlation with mothers' diet. **J Res Med Sci**, 18, 1-5, 2013.

KELISHADI R.; HADI B. *et al.* A study on lipid content and fatty acid of breast milk and its association with mother's diet composition. **J Res Med Sci**, v. 17, p. 824-27, 2012.

LEPAGE, G.; ROY, C. C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. **Journal of Lipid Research**, v. 27, p.114-120, 1986.

LIMA M. F. *et al.* Ácido Graxo ômega 3 docosahexaenóico (DHA: C22:6 n-3) e desenvolvimento neonatal: Aspectos relacionados a sua essencialidade e suplementação. **Nutrire: Rev. Soc. Alim. Nutr.** V. 28, p. 65-77, 2004.

MARGOTTO Paulo R. Leite humano exclusivo para o recém-nascido pré-termo: Evidências para a sua adição. In: MARGOTTO Paulo R. (Ed.). *Assistência ao Recém-Nascido de Risco*, 2ª Edição. Porto Alegre: Anchieta, p. 186-191. 2004.

MARINELLI K. A.; HAMELIN K. Aleitamento materno e o uso do leite humano na unidade de terapia intensiva neonatal. In: MacDonald G. M.; MULLET M. D.; SESHIA M. M. K. *Avery/ Neonatologia: Fisiopatologia e tratamento do recém nascido*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 377-405.

MENESES F, TORRES A.G., TRUGO N.M. Essential and long-chain polyunsaturated fatty acid status and fatty acid composition of breast milk of lactating adolescents. **Br J Nutr.**, v.100, p:1029-37, 2008.

MEREY L. S. F. Repercussões dos ácidos graxos polinsaturados em gestantes e recém-nascidos suplementados com ômega-3 e óleo de linhaça dourada. Campo Grande-MS. Tese [Doutorado em Ciências da Saúde] – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. CENTRO BRASILEIRO DE ANÁLISE E PLANEJAMENTO. Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher. Dimensões do Processo Reprodutivo e da Saúde da criança. Brasília, 2009, p 1-312.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE AÇÕES PROGRAMÁTICAS E ESTRATÉGICAS. II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal. Brasília, 2009, p. 1-108.

MORALES E. *et al.* Genetic Variants of the FADS Gene Cluster and ELOVL Gene Family, Colostrums LC-PUFA levels, breastfeeding, and Child Cognition **Plos One**, v. 6, n 8, fev., 2011.

MORSE L. N. Benefits of docosahexaenoic acid, Vitamin D and Iodine on Foetal and Infant Brain Development and Function Following Maternal Supplementation during Pregnancy and Lactation. **Nutrients**. Reino Unido, v. 4, p. 799-840, 2012.

NG K.-F.; INNIS S. M. Behavioral responses are altered in piglets with decreased frontal docosaxehaenoic acid. **J. Nutr. Canadá**, v.133, p. 3222-3227, 2003.

NISHIMURA R. Y.; CASTRO G. S. F.; JORDAO JR; ALCEU A.; SARTORELLI D. S. Composição de ácidos graxos do leite materno em mulheres residentes em área distante da costa litorânea brasileira. **J. Pediatr.** v. 89, p. 263-268, 2013.

NOGUEIRA C. M. R. Conhecimento sobre aleitamento materno de parturientes e prática de aleitamento cruzado na Unidade Hospitalar e Maternidade Venâncio Raimundo de Souza – Horizonte – Ceará. Rio de Janeiro, 58 f., tab, 2009.

OPPERMAN M.; MARAIS D. W.; BENADE A. J. S. Analysis of omega-3 fatty acid content of South African fish oil supplements. **Cardiovasc J Afr**; v. 22, p 324–329, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA AS SAÚDE. Representação Sanitária Pan-americana. Escritório Regional da Organização Mundial da Saúde. Amamentação, jun., 2003.

PERINI J. A. D. L.; STEVANATO F. B.; SARGI S. C.; VISENTAINER J. E. L.; DALALIO M. M. D. O.; MATSHUSHITA M.; VISENTAINER J. V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune; **Rev. Nutr**, v. 23, n. 8, p. 1075-86, 2010.

SABEL K. G. *et al.* Fatty acid patterns early after premature birth, simultaneously analysed in mothers' food, breast milk and serum phospholipids of mothers and infants. **Lipids in Health and Disease**, v. 20, n. 8, p. 1-15, 2009.

SILVA, D. R. B.; JUNIOR P. F. M.; SOARES E. A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant**, Recife, v. 7, n. 2, p. 123-133, abr./jun., 2007.

SHARMA, S.; ZHUANG Y.; GOMEZ-PINILLA F. High fat acid transitions reduce brain DHA levels associated with altered brain plasticity and behavior. **Sci. Rep.** Los Angeles, v.2, p. 431, 2012.

SHEN J. *et al.* Effect of essential fatty acids on glucose-induced cytotoxicity to retinal vascular endothelial cells. China, **Lipids in Health and Disease**, v. 11, p. 90, 2012.

SMITHERS L. G. *et al.* Higher dose of docosahexaenoic acid in the neonatal period improves visual acuity of preterm infants: result of a randomized controlled trial. **Am. J. Clin. Nutr.** Austrália, v. 88, p. 1049-1056, 2008.

SMITHERS L. G. Feeding preterm infants milk with a higher dose docosahexaenoic acid than that used in current practice does not influence language or behavior in early childhood: a follow-up study of a randomized controlled trial. Austrália, **Am. J. Clin. Nutr.** v. 91, p. 628-634, 2010.

TANG X. *et al.* Short term effects of different omega-3 fatty acid formulation on lipid metabolism in mice feed high or low fat diet. China, **Lipids in health and Disease**. v. 11, p. 70, 2012.

TINOCO, S. M. B. *et al.* Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos *trans* do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 3, p. 525-534, mar. 2007.

TORRES A. G.; TRUGO N. M. F. Evidence of inadequate docosahexaenoic acid status in Brazilian pregnant and lactating women. **Rev.Saúde Pública.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 2, p. 358-368, ago., 2009.

Widdowson E. M. Growth and composition of the fetus and newborn. Assali NS. Eds. Biology of gestation, vol 02. **Academic Press.**, New York, p. 1-49, 1968.



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa / CEP/UFMS



Carta de Aprovação

O protocolo nº 1676 da Pesquisadora Gisele Leite de Abreu intitulado "Comparação do ácido docosahexaenóico (DHA) no leite da mãe do prematuro e da mãe do bebê a termo", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 29 de abril de 2010, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Ernesto Antônio Figueiró Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 04 de maio de 2010.

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa:**Nome e Telefone do Pesquisador:** Gisele Leite de Abreu – 9164-4848**Orientador da Pesquisa:** Dr Durval Batista Palhares – 9982-1927

Mãe você está sendo convidada a participar desta pesquisa que tem como finalidade comparar os nutrientes contidos no leite humano da mãe do bebê prematuro (menos de 37 semanas de gestação) com a mãe do bebê a termo (mais de 37 semanas de gestação).

Ao participar deste estudo será necessário a doação de 5 mL do seu leite materno, em cada fase, sendo 3 fases e totalizando 15 ml retirado de apenas uma mama até o seu esvaziamento completo. A coleta ocorrerá em 3 momentos: a primeira coleta será até o 7º dia após a descida do seu leite, a segunda ocorrerá do 8º ao 15º dia após a descida do leite e a última será depois de 15 dias que o leite desceu.

Você mãe terá a liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone da pesquisadora do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Haverá uma ficha a ser preenchida com dados pessoais e algumas informações de alimentação e hábitos durante a gestação, que é muito importante para a pesquisa.

Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente a pesquisadora e o orientador terão conhecimento dos dados.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Confiro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS): 3387-3093 - Ramal 2299

APÊNDICE II**FICHA CADASTRAL**

Nome: _____

Data de Nascimento: _____

Naturalidade: _____

Telefone: _____

Endereço: _____

Cidade: _____

Estado: _____

Profissão: _____

História Progressiva

Realizou pré-natal? () SIM () NÃO Quantas consultas? _____

Peso no início da gestação (Kg) _____ Peso final: _____

Intercorrências na gestação? () SIM () NÃO Qual? _____

HIV (AIDS) () Positivo () Negativo

HTLV () Positivo () Negativo

Tagismo? () SIM () NÃO Maço/dia: _____

Etilismo? () SIM () NÃO

Drogas: () Medicamento () Abuso () Nenhuma

Descrição da droga: _____

Dosagem da droga: _____

Hábitos alimentares

Come peixe e/ou frutos do mar com que frequência? _____

Consome alimento com gordura trans? _____

Dados do neonato

Idade Gestacional/DUM: _____ Ballard: _____

Peso: _____ Nascimento: _____ Perímetro Cefálico: _____

Altura: _____

Dados do Leite materno:

Dosagem DHA: _____

Transição: _____

Colostro: _____ Maduro: _____

APÊNDICE III

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Campo Grande, 19 de outubro de 2009.

Prof. Dr. José Carlos Dorsa Pontes
MD Diretor Geral do Núcleo do Hospital Universitário da UFMS

Prezado Senhor,

Declaramos estar cientes e de acordo com a realização do projeto de pesquisa intitulado “COMPARAÇÃO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) NO LEITE DA MÃE DO PRÉ MATURO E DA MÃE DO BEBÊ A TERMO” de responsabilidade da aluna Gisele Leite de Abreu, sob a orientação do Prof. Dra. Carmen Silvia Martimbianco de Figueiredo a ser desenvolvido nos Laboratórios do Departamento de Tecnologia Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) e do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET) da Universidade de Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Atenciosamente,

Dr. Durval Batista Palhares

Chefe do Departamento de Pediatria

Técnico em Laboratório da SEAC/NHU

Setor de Pesquisa em Pediatria/NHU/UFMS/FUFMS
FACULDADE DE MEDICINA “Dr. HÉLIO MANDETTA”
Av. Senador Felinto Muller, S/N, Ipiranga Fone: 67 3345 7395
CEP 79008-090 * Campo Grande (MS) *