



PROGRAMA DE APRIMORAMENTO
PROFISSIONAL
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS



GIOVANA FERNANDA COSI BENTO
LARISSA BRITO BASTOS

**Procedimento Operacional para dosagens dos Contaminantes
Inorgânicos Iônicos Cromo e Chumbo em Leite Humano no HCFMRP-USP**

RIBEIRÃO PRETO

2017

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE – SES – SP
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS – CRH
GRUPO DE DESENVOLVIMENTO DE RECURSOS HUMANOS – GDRH
CENTRO DE FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS PARA O SUS
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL – PAP

GIOVANA FERNANDA COSI BENTO
LARISSA BRITO BASTOS

Procedimento Operacional para dosagens dos Contaminantes
Inorgânicos Iônicos Cromo e Chumbo em Leite Humano no HCFMRP-USP

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional - SES-SP, elaborada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Departamento de Apoio Médico.

Área: PAP Análises Clínicas

Orientador(a): Prof. Dr. José Simon Camelo Júnior

Supervisor(a) Titular PAP: Tânia Maria Beltramini Trevilato

RIBEIRÃO PRETO

2017

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente à Deus, pelo dom da vida, pela força e paciência nos momentos difíceis.

Às nossas famílias, que nos apoiaram e nos motivaram mesmo quando estivéssemos ausentes.

Às nossas supervisoras, especialmente Tânia Trevilato, por todo ensinamento, apoio e orientação durante essa jornada de aprendizagem; ao Prof. Dr. José Simon pela oportunidade de trabalhar com um tema importante para a Saúde Pública; ao Banco de Leite de Ribeirão Preto pela estrutura que possibilitou a realização do estudo; ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto HCFMRP-USP e SES que nos contribui com a bolsa de fomento para nossas atividades.

Às nossas colegas de trabalho, pela amizade construída durante esse ano, e especialmente à Amanda Borges e Thaís Fracadosso, que estiveram conosco durante os experimentos nos auxiliando nas técnicas utilizadas; às pós graduandas Mariana Oliveira e Vanessa Bonfim pelo suporte teórico.

Por fim, agradecemos a oportunidade de trabalharmos juntas, o que nos permitiu passar pelos momentos delicados sem dificuldades, e com muita amizade.

RESUMO

O aleitamento materno é uma atividade de suma importância tanto para o bebê quanto para as mães e, de acordo com a OMS, deve ser a única forma de alimentação dos neonatos até os seis meses de idade. Dentre os componentes do leite materno encontram-se elementos imunológicos além de macro e micro nutrientes essenciais. No entanto, contaminantes inorgânicos iônicos presentes no ambiente, como cromo, chumbo, cádmio, mercúrio, selênio e outros são micronutrientes tóxicos que podem interferir na composição do leite, prejudicando o lactente. O objetivo deste trabalho é elaborar um Procedimento Operacional para dosagem de Cr e Pb no LH. Foram utilizadas 42 amostras, divididas em 21 pares, sendo enviadas do Banco de Leite do hospital, cada par composto por uma amostra do LH in natura (Baseline) e outra de leite com adição do próprio leite liofilizado na proporção 2:1 (Concentrado). Foram testados quatro tipos diferentes de preparo prévio das amostras, realizados no Setor Metais do Laboratório de Pediatria do HCFMRP-USP. Dentre os preparos testados, constatou-se que o mais adequado envolvia digestão das amostras em bombas de Teflon com ácido nítrico suprapur na proporção 1/1, posterior diluição 1:5 em água ultra pura, microcentrifugação a 13.000RPM e leitura no EAA FG 640Z seguindo as rampas de aquecimento padronizadas no setor, com ponto de atomização 2600°C para Cr e Pb, comprimentos de ondas específicos da LCO para Cr 357,9 e Pb 283,3 nm, em tubo de grafite partition, usando 20 ul de amostra do preparado para cromo com curva de calibração de padrões de 5, 10 e 20 ug/L e 25 ul para o chumbo, 20 ul da amostra e 5ul de um modificador de matriz, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, baseando-se em curva de calibração de 10,20,30,40 ug%. Encontramos em 90,5% das amostras valores de Cr variando entre 0,27 à 2,27 $\mu\text{g/L}$, de forma semelhante às variações nos estudos observados, entre 0,9 e 3,72 ug/L. Para o Pb valores na ordem de 0,29 à 2,90ug% foram obtidos em 88% das amostras, o que vem de encontro as literaturas, 0,20 a 1,68ug%. Para validação da metodologia fizemos acréscimo de padrão no LH baseline e concentrado tendo 100% da amostragem satisfatória.

Palavras chave: Procedimento Operacional, Leite humano, Cromo, Chumbo, Espectrofotometria de Absorção Atômica.

Sumário

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
1. Introdução.....	9
1.1. O leite materno	9
1.2. Cromo (Cr).....	12
1.3. Chumbo (Pb)	14
2. Objetivo.....	17
3. Materiais e métodos.....	17
3.1. Materiais	17
3.1.1. Coleta e Pasteurização das amostras.....	18
3.1.2. Armazenamento das Amostras	20
3.2. Métodos.....	20
3.2.1. Instrumental	20
3.2.2. Equipamento de Análise	21
3.2.3. Preparo Prévio das Amostras	28
3.3. Análise estatística.....	33
4. Resultados.....	34
5. Discussão	40
5.1. Cromo.....	40
5.2. Chumbo.....	41
5.3. Considerações	43
6. Conclusão.....	45
7. Referências	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS: Atomic Absorption Spectrometry

AME: Aleitamento Materno Exclusivo

B: Baseline

BLH: Banco de Leite Humano

BM: Banho Maria

C: Concentrado

Cr: Cromo

EEA: Espectrôfotometro de Absorção Atômica

HNO₃: Ácido Nítrico

Kcal: Quilocalorias

LCO: Lâmpada de Cátodo oco

LH: Leite Humano

OMS: Organização Mundial da Saúde

PO: Procedimento Operacional

Pb: Chumbo

Rep: Repetição

SI: Solução Intermediária

UP: Ultra Pura

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constituintes qualitativos do leite materno

Tabela 2: Configurações Equipamento SpectrAA-640Z para Chumbo

Tabela 3: Rampa de Aquecimento para Chumbo

Tabela 4: Configurações Equipamento SpectrAA-640Z para Cromo

Tabela 5: Rampa de aquecimento para Cromo

Tabela 6: Leitura de Chumbo em amostras de Leite Humano Baseline

Tabela 7: Leitura de Chumbo em amostras de Leite Humano Concentrado

Tabela 8: Leitura de Cromo em amostras de Leite Humano Baseline

Tabela 9: Leitura de Cromo em amostras de Leite Humano Concentrado

Tabela 10: Leitura de concentração de Chumbo em Leite Humano Baseline e Concentrado com acréscimo de solução intermediária

Tabela 11: Leitura de concentração de Cromo em Leite Humano Baseline e Concentrado com acréscimo de solução intermediária

Tabela 12: Leitura de concentração de Chumbo em Leite Humano Baseline e Concentrado com preparo prévio D

Tabela 13: Leitura de concentração de Cromo em Leite Humano Baseline e Concentrado com preparo prévio D

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aparelho modelo EspectrAA 640Z, marca Varian, utilizado para análises do Chumbo e Cromo.

Figura 2: Tubo de Grafite Partition utilizado para análises do Chumbo e Cromo.

Figura 3: Curva de calibração para Chumbo no aparelho EspectrAA 640Z

Figura 4: Curva de calibração para Cromo no aparelho EspectrAA 640Z

Figura 5: Bomba de Teflon.

1. Introdução

1.1. O leite materno

O aleitamento materno tem grande importância na vida e sobrevivência do recém-nascido pois atende as necessidades imunológicas, nutricionais e psicológicas da criança (PARADA et al., 2005). Essa prática traz benefícios tanto para as crianças, quanto para as mães, que têm o risco reduzido em 66% de desenvolver câncer de mama (REA, 2008). Além disso, segundo KAC et al. (2004), a diminuição do peso pós parto também está relacionada ao tempo de aleitamento materno (KAC et al., 2004). De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde), as crianças devem ter aleitamento materno exclusivo até os seis meses de idade, sendo este aconselhável até os dois anos de idade, quando possível. No Brasil, de acordo com um estudo em 2009, a prevalência do aleitamento materno exclusivo (AME) foi 41%. Já nas capitais, entre as crianças de 9 a 12 meses, a prevalência foi de 58,7% (BRASIL, 2009).

O leite materno é uma fonte rica de nutrientes necessários às crianças, e é composto por macro e micronutrientes, sendo suas concentrações variáveis de acordo com alguns fatores, incluindo a dieta materna durante a gravidez. A lactose é o principal açúcar presente na composição do leite materno, assim como a presença de ácidos oleico e palmíticos na categoria das gorduras. Os principais minerais constituintes do leite materno são sódio, potássio, cálcio (25-35 mg/100ml), magnésio, fósforo (13-16 mg/100ml) e cloro. Outros minerais como ferro, zinco e cobre, têm suas concentrações variadas. Em torno de 25% do nitrogênio presente neste leite é representado por compostos não proteicos, como ureia, creatinina, e amino ácidos. Além disso, todas as vitaminas, com exceção da vitamina K, são encontradas em concentrações significantes (Tabela1) (PICCIANO, 2001).

A composição do leite materno com relação aos macronutrientes difere de acordo com a idade gestacional no momento do parto. Isso implica dizer que em recém-nascidos pré termo o leite tem em sua composição níveis maiores de proteína e gordura. O sistema imune dos recém-nascidos é considerado imaturo no momento do nascimento e são os anticorpos da mãe que irão participar da defesa contra possíveis patógenos. Dessa maneira, o leite materno irá proteger o recém-nascido contra infecções e inflamações por

conter fatores imunológicos que irão ajudar na construção da barreira inicial do neonato. Citocinas presentes no leite podem ter a função de defesa contra infecções (reduzindo assim, as chances de inflamação), ou a exacerbação das inflamações, ativando a resposta do sistema imunológico, que a partir de então, começa a amadurecer (BALLARD; MORROW, 2014).

Tabela 1: Constituintes qualitativos do leite materno

Proteínas	Vitaminas Hidrolíticas	Carboidratos	Minerais e Íons
Alfa-Lactalbumina	Biotina	Lactose	Bicarbonato
Beta-Lactoglobulina	Colina	Oligossacarídeos	Cálcio
Caseína	Folato	Glicopeptídeos	Cloreto
Enzima	Inositol	Fatores Bífidos	Citrato
Fatores de Crescimento	Niactina		Magnésio
Hormônios	Ácido Pantotênico		Fosfato
Lactoferrina	Ribloflavina		Potássio
Lisosimas	Titamina		Sódio
IgA e outras Igs	Vitamina B12		Sulfato
	Vitamina B6		
	Vitamina C		
Compostos Não-Proteícos Nitrogenados	Células	Lipídeos	Traços Minerais
Alfa-Aminonitrogeno	Células Epiteliais	Vitaminas Lipofílicas	Cromo
Creatina	Leucócitos	Caroteno	Cobalto
Cr eatinina	Linfócitos	Vitamina A	Cobre
Glucosamina	Macrófagos	Vitamina D	Fluor
Ácidos Nucléicos	Neutrófilos	Vitamina E	Iodo
Nucleotídeos	Fragmentos do citoplasma	Vitamina K	Ferro
Poliaminas		Ácidos Graxo	Manganês
Ureia		Fosfolipídeos	Molibdênio
Ácido Úrico		Triglicerídeos	Níquel
		Esteróis	Selênio
		Hidrocarbonos	Zinco

Fonte: PICCIANO, 2001

Além dos macro e micronutrientes essenciais presentes na composição do leite, existem outras substâncias que podem estar presentes e causar efeitos adversos nos lactentes. Essas substâncias atravessam as barreiras

celulares e se difundem no leite e, dessa forma, chegam ao organismo da criança. Um exemplo dessas substâncias são os medicamentos usados pelas mães durante e após a gravidez, que podem contaminar o leite, (SPENCER; MEMORIAL, 2001), e por diversas vezes são a causa da interrupção do aleitamento materno precoce. A concentração de medicamento no leite está relacionada diretamente às doses ingeridas pela mãe e, por esse motivo, é fundamental o conhecimento do médico sobre a utilização dessas substâncias. O fumo também é uma substância que está presente no leite materno e pode ir para o organismo do lactente, ainda, pode levar à diminuição da produção de leite. Além dessas substâncias, pode existir também a presença de metais pesados diferentes dos metais essenciais constituintes do leite mencionados anteriormente, capazes de prejudicar o desenvolvimento da criança, como o chumbo, cromo, cádmio e mercúrio. Além desses, também são monitorados na saúde pública o manganês, níquel, arsênico, entre outros (PEIRANO, 2003).

Os metais pesados são provenientes da contaminação do leite materno por ingestão de água e alimentos contaminados que têm origem em um solo previamente contaminado, assim como pelo contato da pele ou respiração (NICKERSON, 2006). Os metais pesados são exemplos de poluentes ambientais que podem ser transmitidos no leite humano. Substâncias que são contaminantes do leite materno têm alta lipossolubilidade, gerando lento metabolismo e excreção dos mesmos (DEL CIAMPO; RICCO, 1998). Eles são definidos por terem densidade superior a 5g/cm^3 e estão presentes em diferentes situações do cotidiano como em pigmentos, indústrias, construções, entre outros, até mesmo em cosméticos. As atividades realizadas pelos seres humanos são a principal causa das alterações ambientais que podem acarretar à poluição do meio ambiente por esses tipos de substâncias. Por esse motivo, é necessária a aplicação de projetos e políticas públicas que estejam relacionadas à esse assunto (MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT, 2004).

Com o passar dos anos têm sido crescentes os efeitos na saúde relacionados aos poluentes e alterações no meio ambiente. Dessa maneira, houve um aumento também nos estudos relacionados aos efeitos adversos causados na população, observando o grande impacto dos poluentes em

crianças (PRATES, 2006). Estudos mostraram que a exposição a determinados tipos de metais pesados, como o chumbo, cádmio e mercúrio, pode induzir alergias e doenças autoimunes, pelo resultado da produção de autoanticorpos (CARDOSO, 2010). Além disso, determinados metais pesados podem causar a supressão da apoptose, acarretando o desenvolvimento de linhagens celulares anormais, que estão relacionadas à autoimunidade e cânceres (CARDOSO, 2010; RANA, 2008).

Dentre os metais pesados, chamados assim por um erro vicioso de linguagem visto que são contaminantes inorgânicos iônicos provenientes do meio ambiente e podem interferir na composição do leite materno, destacam-se cromo e chumbo.

1.2. Cromo (Cr)

O Cromo é um metal pesado presente no ambiente e em nutrientes, no entanto é historicamente conhecido e assimilado à história de indústrias de manufaturas de produtos como aço inoxidável e solda. As formas mais comuns de Cr são a trivalente (Cr III) e a hexavalente (VI), sendo a primeira termodinamicamente estável e encontrada em alimentos, incluindo o leite materno, e a segunda, tóxica, encontrada em poluentes (SALNIKOW; ROOM, 2009).

No corpo humano, o Cr III é um nutriente essencial que participa do metabolismo dos lipídios e carboidratos, no entanto, ele tem baixa absorção no trato gastrointestinal. As taxas de absorção do Cr III contido em alimentos varia de 0,4% a 2,5% do total consumido e a porção absorvida é armazenada no fígado, baço, tecidos moles e ossos, o restante é expelido pelas fezes (QUINTEROS et al., 2007). No leite materno, estudos apontam que as concentrações de cromo variam de 0,3 a 0,4µg/L (CASEY; HAMBIDGE, 1984).

Ao contrário da forma trivalente, o Cr VI é altamente tóxico, principalmente por ser um agente oxidante(QUINTEROS et al., 2007), sendo a principal causa de câncer no trato respiratório além dos efeitos adversos causados nas funções reprodutivas, no fígado, nos rins e em tecidos nervosos. Seu potencial carcinogênico é aumentado quando somado à exposição de

outros agentes carcinógenos, que atuam sinergicamente com o Cr VI, como tabaco e raios UV (QUINTEROS et al., 2007; SALNIKOW; ROOM, 2009).

A principal forma de exposição ao Cr VI é a ocupacional, que ocorre principalmente em trabalhadores industriais durante fabricação de cromato, cromagem, soldagem de aço inoxidável além de curtume (processamento de couro), tintas e esmaltes. A exposição ocupacional de compostos com Cr VI é considerada uma das causas do desenvolvimento de câncer no trato respiratório de trabalhadores industriais e soldadores, sendo estimado 10 a 45 entre 1000 mortes em trabalhadores expostos (QUINTEROS et al., 2007; SALNIKOW; ROOM, 2009).

No entanto, por conta deste metal estar presente em produtos como tintas e pigmentos, a exposição ambiental também deve ser considerada, principalmente porque, como todos os metais, o cromo não é biodegradável e, desta forma, persiste no ambiente. Ela ocorre principalmente pela ingestão de água contaminada devido à proximidade de fontes à indústrias e fábricas de manufaturas de cromo que despejam resíduos contaminados com Cr VI. Ainda, a exposição ambiental pode ocorrer pela presença de partículas deste metal emitidas por conversores automobilísticos, que se concentram no ar em áreas densamente populosas (QUINTEROS et al., 2007; SALNIKOW; ROOM, 2009). Desta forma, nota-se que a exposição à forma tóxica do cromo ocorre exclusivamente devido a atividades antrópicas.

A forma hexavalente deste íon, assim como o Cr III, consegue internalizar as células (ao ser absorvido no trato gastrointestinal) através de canais de sulfato devido à sua semelhança com fosfatos e sulfatos; no ambiente intracelular, o Cr VI sofre redução até sua última forma, o Cr III. No entanto, durante este processo de redução são gerados os intermediários Cr IV e Cr V, além de espécies reativas de oxigênio. Este evento é responsável pela geração de danos genotóxicos, teratogenicidade e outras formas de toxicidade deste metal, que variam de acordo com o tipo celular, a concentração do metal no organismo e o tempo de exposição. Estudos com ratos mostraram que o Cr VI pode se acumular na hipófise anterior, afetando a liberação do hormônio prolactina, o que pode diminuir a indução da produção de leite em seres

humanos e, desta forma, afetar a nutrição de lactentes (CARDOSO, 2010; QUINTEROS et al., 2007; SALNIKOW; ROOM, 2009).

1.3. Chumbo (Pb)

O chumbo (Pb) é um metal pesado com alto potencial tóxico e tem se tornado um problema de saúde pública devido à seus efeitos adversos (KOYASHIKI et al., 2010). Os principais efeitos deste metal são o de interferir na biossíntese do heme dos eritrócitos e no metabolismo e absorção do cálcio, que podem levar ao desenvolvimento de uma anemia. Além da sua capacidade de alterar estrutura e função de determinadas proteínas ao ligar-se à grupos sulfidrilas (CUNNINGHAM, 2007). Soma-se à esses efeitos, o de interferir nos sinais de transmissão dos neurônios, na bomba de sódio e potássio das membranas celulares e no metabolismo da vitamina D. Ainda, o Pb pode suprimir as glândulas adrenais e tireóide (RANA, 2008).

Assim como os outros metais, a exposição ao Pb pode ocorrer de forma ambiental e ocupacional. A principal forma de exposição ambiental ocorre por alimentos, água ou ar contaminados; mais atualmente, estudos comprovaram a contaminação de alimentos pela utilização de panelas e recipientes esmaltados (DOREA; DONANGELO, 2006). A exposição ocupacional ocorre mais comumente em trabalhadores de fábricas de bateria, fundição e produção/manutenção de radiadores (CUNNINGHAM, 2007). No entanto, seus efeitos tóxicos irão depender do período de exposição e estados fisiológico e nutricional do indivíduo (DOREA; DONANGELO, 2006).

Cerca de 10% a 15% da quantidade de Pb ingerida é absorvida pelo trato gastrointestinal, podendo esta porcentagem aumentar em casos de o organismo estar em deficiência de ferro, jejum ou em casos de gestantes. Após absorção, o Pb liga-se à eritrócitos e, em um período de semanas, é depositado preferencialmente nos ossos, mas também no fígado, rins, medula e cérebro. Como o corpo humano não possui nenhum processo ativo de eliminação do metal, esta pode acontecer pela descamação da pele, crescimento das unhas, secreção biliar e filtração glomerular (CUNNINGHAM, 2007).

Devido à sua semelhança estrutural e iônica com o cálcio, o Pb consegue ser absorvido no intestino e deposita-se nos ossos, ficando lá como reservatórios. Nos rins, pode causar fibrose intersticial e nefropatia progressiva, além de afetar o sistema renina-angiotensina, causando hipertensão (CUNNINGHAM, 2007). A eritropoiese também é prejudicada com a exposição ao Pb visto que este inibe a síntese de protoporfirina e absorção de ferro, necessários para a formação de novas células sanguíneas. No sistema nervoso central, o Pb afeta o desenvolvimento comportamental e cognitivo em crianças e adultos (DOREA; DONANGELO, 2006) e esses efeitos podem persistir mesmo que os níveis do metal no organismo voltem para seus valores de referência normais (KOYASHIKI et al., 2010).

Os sintomas de exposição ao Pb são difíceis de se definir devido à fatores intrínsecos do hospedeiro e à natureza inespecífica dos sintomas, que podem variar entre fadiga, dificuldade de concentração, perda de peso, náusea e mialgia. Apesar disso, as características clássicas que são consequências de sua alta toxicidade são: cólicas abdominais, doença renal, encefalopatia, convulsões e neuropatia periférica. O Pb também está associado à anormalidades espermáticas e aborto (CUNNINGHAM, 2007).

Quanto aos mecanismos de ação à nível molecular, o Pb simula a ação do cálcio e seu excesso no interior da célula pode levar à apoptose por despolarizar as membranas da mitocôndria, resultando na liberação do citocromo C, ativação de caspases e consequente apoptose. O Pb também é capaz de se acumular no núcleo das células e, apesar de não causar efeitos tóxicos diretos, aumenta a susceptibilidade à outros agentes genotóxicos. Além disso, ele interfere nos mecanismos de reparo do DNA e liga-se às histonas, diminuindo a proteção ao material genético (RANA, 2008).

Quanto à influência do Pb durante a gestação, sabe-se que sua absorção é maior neste período e que o metal é capaz de ultrapassar as barreiras placentárias, sendo transferido para o feto, e de se acumular em tecidos fetais (AL-SALEH et al., 2013). Foi observado que 80% dos níveis de Pb no sangue materno estão contidos no sangue do feto, por isso, os níveis maternos de Pb não podem ultrapassar $0,63\mu\text{mol/L}$ (CUNNINGHAM, 2007). A retenção de metais na placenta ou a transferência deles para o feto pode ter

efeitos adversos tanto para o desenvolvimento fetal quanto no curso e prognóstico gestacional (AL-SALEH et al., 2013). Além da transmissão via placenta, o Pb contido no sangue materno, decorrente da exposição da mãe ao metal ou de seu reservatório nos ossos, pode ser secretado no leite materno e expor o bebê pela alimentação (ETTINGER et al., 2004).

A exposição ao Pb durante o desenvolvimento fetal e amamentação dependem da quantidade do metal no corpo da mãe e dos fatores que regulam seu transporte para a placenta e glândula mamária. A gravidez e lactação são períodos de grande necessidade de cálcio, o qual fica armazenado principalmente nos ossos, assim como o Pb (DOREA; DONANGELO, 2006). Estima-se que 5% da massa óssea da mulher é mobilizada durante a lactação (NASCIMENTO, 2006). Desta forma, o Pb será mobilizado dos ossos juntamente com o cálcio nesses períodos, aumentando os níveis deste metal no sangue materno. Alguns estudos atestam que a baixa ingestão de cálcio pela lactante favorece o maior recrutamento de chumbo dos ossos e, conseqüentemente, maior liberação deste no leite (DOREA; DONANGELO, 2006).

A principal fonte de Pb no leite humano são os ossos e a alimentação materna e sua mobilização continua até seis meses após o parto. No entanto, estudos mostraram que os níveis de Pb tendem a diminuir ao longo da lactação (ETTINGER et al., 2006). Este fato pode ser em partes explicado pelas diferenças na composição do colostro e do “leite maduro”, visto que o colostro tem níveis mais elevados de chumbo que o “leite maduro”, caracterizado por ter mais proteínas e menos gordura em sua constituição. Ainda, acredita-se que o Pb tem baixo coeficiente de transferência do sangue para o leite devido à sua alta afinidade com proteínas do sangue, mas os resultados são controversos quanto à isso (KOYASHIKI et al., 2010).

A exposição ao Pb para o bebê é mais quantitativamente significativa durante o período pré-natal do que durante a amamentação (DOREA; DONANGELO, 2006)(DOREA); ainda assim, nos primeiros 60 a 90 dias de vida do neonato, o leite materno contaminado contribui para 36% a 80% da quantidade de chumbo no sangue do bebê (ETTINGER et al., 2004). O cérebro fetal tem maior sensibilidade aos efeitos tóxicos do Pb comparado ao cérebro

de um adulto, pois a barreira encefálica dos fetos é imatura e incapaz de promover proteção suficiente para o órgão (KOYASHIKI et al., 2010), o que agrava ainda mais a situação de exposição ao Pb pelo leite.

Como o Pb é capaz de se acumular no organismo humano por longos períodos de tempo, o feto é vulnerável e susceptível aos seus danos mesmo que a mãe tenha deixado de ser expor ao metal muitos anos antes da gestação. A meia vida do Pb no leite, assim como no sangue, é de 35 dias (KOYASHIKI et al., 2010). Para um recém-nascido de 3kg, o valor máximo de ingestão diária de Pb permitido é 3,6µg/dia (NASCIMENTO, 2006).

Apesar da facilidade de exposição dos recém-nascidos pelo leite materno e dos efeitos adversos do chumbo, assim como de outros metais pesados como cádmio e cromo, os benefícios do aleitamento materno devem ser avaliados por um conjunto complexo de dados. Por isso, pode-se afirmar que o aleitamento materno é seguro e recomendado até os seis primeiros meses de vida do lactente. Ainda assim, o monitoramento do leite para a presença destes metais se faz importante, visto as consequências da exposição ao cádmio, cromo e chumbo não só para o lactente, mas também para a lactante.

2. Objetivo

Elaborar Procedimento Operacional para dosar Cromo e Chumbo no Leite Humano.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

Utilizou-se para otimização das metodologias analíticas de Cr e Pb no leite humano o excedente do leite maduro doado por mulheres em idade reprodutiva que realizaram a coleta em seus domicílios ou no Banco de Leite Humano (BLH) do HCFMRP- USP de Ribeirão Preto, São Paulo, no período de janeiro a agosto de 2016. As replicatas destes leites fazem parte da tese de doutorado intitulada “Concentração de Micronutrientes no Concentrado com Liofilizado de Leite Humano para Alimentação de Recém-nascidos Pré-termo

de muito baixo peso” de Mariana Moraes de Oliveira, nutricionista, pós graduanda pelo Depto Puericultura e Pediatria do HCFMRP-USP.

As mulheres cujo excedente de leite foi utilizado para esta pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) concordando com sua participação no estudo prospectivo que fazem parte de um Projeto (com nº chamada 05/2013), trabalhos financiados pela Fundação Bill e Melinda Gates em parceria com Ministério da Saúde e CNPq, intitulado na primeira etapa como “Elaboração de um concentrado com liofilizado de leite humano para alimentação de recém-nascido pré-termo de muito baixo peso”.

3.1.1. Coleta e Pasteurização das amostras

Todas as mostras de leite humano foram coletadas manualmente, pela ordenha da própria doadora, ou de forma mecânica, pela ordenhadeira em sistema fechado para evitar contaminação, e acondicionados em recipientes de vidro para manter as propriedades nutricionais e principalmente as imunológicas do leite humano. Os frascos de coleta foram devidamente identificados de acordo com as doadoras e imediatamente armazenados em freezer a -20°C. Nos casos das coletas domiciliares, as mulheres doadoras eram devidamente instruídas para realizarem o procedimento de forma apropriada e acondicionavam o leite no freezer de suas casas até serem transportados (duas vezes por semana), para o BLH do HCFMRP-USP situado na Av. Santa Luzia nº387, Jardim Sumaré em Ribeirão Preto.

Dentre as recomendações para coleta das amostras, deve-se mencionar o desprezo do primeiro jato de leite, correta higienização das mãos, uso de máscara e touca (fornecidas pelo BLH) além de cuidados como evitar fios de cabelos ou ciscos dentro do frasco de coleta para que o material não seja desprezado. A validade do leite após coleta é de aproximadamente sete dias antes de ser pasteurizado desde que mantido congelado; após a pasteurização, sua durabilidade aumenta para quinze dias.

No BLH utilizou-se 2 mL de todos os leites recém-chegados para análise de acidez e caloria para que eles fossem separados e classificados de acordo com seu valor nutricional e apenas os leites com valor energético entre 500 e

700 Kcal/L foram utilizados para as dosagens dos oligoelementos propostos no presente estudo.

Todas as amostras passaram pelo processo de pasteurização seguindo o seguinte protocolo:

- Seleção dos leites que serão pasteurizados de acordo com o valor energético e período do leite (colostro- transição- maduro);
- Descongelamento em banho maria para o re-embalamento em frascos de boro-silicato, os quais são mais resistentes à alterações bruscas de temperatura;
- Pasteurização: os leites em geladeira na temperatura de 5-7°C são colocados em banho-maria a 64°C, onde ficam por quinze a vinte minutos sob agitação manual a cada cinco minutos. A temperatura dos leites vai aumentando gradativamente e todos os valores de temperatura que o leite atinge são anotados. O início da pasteurização se dá quando o leite atinge 62,5°C;
- Após seu início, a pasteurização dura trinta minutos com as amostras sendo manualmente agitadas constantemente;
- Após o término do aquecimento, as amostras de leite passam por resfriamento súbito em resfriador para que atinjam 4-5°C rapidamente.

Posteriormente, é pipetado uma alíquota de 5 mL do leite pasteurizado para cultura em caldo verde bili-brilhante para controle microbiológico do material. Feito a pasteurização e checagem microbiológica, os leites são distribuídos conforme a necessidade nutricional dos bebês que vão recebe-los.

Para este projeto, os leites maduros coletados foram liofilizados em Liofilizador L-108 Liotop e reconstituídos em momento prévio à sua pasteurização. O objetivo da liofilização era usar o leite em pó como complemento nutricional. O liofilizado de leite humano terá menor custo e maior valor nutricional do que formulações industrializadas para complementação nutricional. Logo, cada amostra de leite humano recebeu como complemento o

liofilizado da própria amostra, ou seja, a amostra de leite de uma doadora foi complementada com o liofilizado da própria doadora em proporções de 50mL de leite liofilizado reconstituído em 75mL do mesmo leite sem liofilizar. Desta forma, este novo leite, denominado de leite Concentrado, ficou 2/3 mais forte que o leite sem complementação do liofilizado, denominado Baseline.

3.1.2. Armazenamento das Amostras

Realizados todos os procedimentos, as amostras foram passadas para tubo cônico polietileno de 50 mL e mantidas armazenadas em freezer a -20°C no BLH. Posteriormente foram transferidas para o Laboratório de Pediatria-Setor Metais do HCFMRP-USP, mantidas em freezer para material biológico a menos 20°C até seu processamento.

Para este estudo foram utilizadas 21 amostras, divididas em pares sendo uma delas a versão *Baseline* (B), que consistia no leite sem o acréscimo de leite liofilizado da mesma doadora e a versão *Concentrada* (C), que tinha o acréscimo de leite liofilizado da mesma doadora do B, realiquotadas em 4 tubos de polietileno de 3,6 ml previamente lavados com ácido nítrico 30% *overnight* para posterior dosagens de contaminantes inorgânicos.

Foram utilizados dois destes tubos realiquotados, que seriam reservas excedentes, para os testes de formulação de um procedimento operacional padronizado para chumbo e cromo.

3.2. Métodos

3.2.1. Instrumental

Todo material do Laboratório de Pediatria utilizado para o processamento das amostras de leite foi previamente desmineralizado em banho de ácido nítrico (HNO₃) a 30% por período *over night* (12h) e posteriormente enxaguados com água ultrapura à 18,2 MΩ/cm (Sistema MILLI-Q) sem contato com papel, procedimento padrão do Setor de Metais para Lavagem de Materiais do HCFMRP-USP.

Dentre estes materiais, se encontram:

- Tubos cônicos, 50 mL

- Béquer 50 mL,
- Balão volumétrico de 10 mL e 5mL,
- Bombas de Teflon
- Tubos de ensaio de vidro de 10mL
- Copetes Polipropileno de 2 mL
- Pipetas volumétricas de volumes reguláveis
- Centrífugas

Materiais descartáveis consumíveis:

- Ponteiras de 100ul a 1000 μ L
- Eppendorfs 1000 μ L
- Tubos de polietileno 3,5 mL
- Pipetas de transferência em polietileno, descartáveis

3.2.2. Equipamento de Análise

A presença dos metais Cr e Pb nas amostras de leite humano foi avaliada pela técnica de espectrofotometria realizada pelo Espectrômetro de Absorção Atômica em Forno Grafite (SpectrAA-640Z) com corretor baseado no efeito Zeeman para correção de fundo e lâmpadas de cátodo oco (LCO) de Cr (7 mA) e Pb (5 mA), nos comprimentos de onda de 357.9nm e 283.3nm, respectivamente.

O método de espectrofotometria de absorção atômica baseia-se na quantificação de elementos a partir da absorção da radiação emitida pela lâmpada de cátodo oco pelos átomos livres da amostra em estado gasoso.

Figura 1: Aparelho modelo EspectrAA 640Z, marca Varian, utilizado para análises do Chumbo e Cromo.



Figura 2: Tubo de Grafite Partition utilizado para análises do Chumbo e Cromo:



As rampas de aquecimento provocam a pirólise (fenômeno de decomposição térmica) das amostras. Passa-se por um tempo de queima muito diferenciado para cada tipo de material (águas, sangue, soro, urina, leite,

etc) pois possuem densidades diferentes e quantidades de proteínas, açúcares ou gorduras muito específicos. As amostras preparadas previamente permaneceram alguns segundos em temperaturas mais baixas ($<$ que 150°C) para secar o volume (de 5 a 30 microlitros) injetado dentro do tubo de grafite, outros segundos em temperaturas intermediárias (entre 400 e 800°C) para virar cinzas e outros para atomizar ($>$ que 2200°C), vaporizar os átomos a partir de suas moléculas. Esses segundos e temperaturas adequadas é que proporcionam a grande dificuldade nas otimizações das metodologias almejadas.

Tabela 2: Configurações Equipamento SpectrAA-640Z para Chumbo

Method: Pb (Zeeman)	
Element Matrix:	Pb -
Instrument Type:	Zeeman
Conc. Units:	µg%
Instrument mode:	Absorbance
Sampling mode:	Autonormal
Calibration mode:	Concentration
Measurement mode:	PROMT Height
Replicates Standard:	1
Replicates Sample:	1
Precision Standard:	5.0%
Precision Sample:	5.0%
Expansion Factor:	1.0
Minimum Reading:	Disabled
Smoothing:	5 point
Conc. Dec. Places:	2
Wavelength:	283.3 nm
Slit Width:	0.5 nm
EHT:	341 volts
Lamp Current:	5.0 mA
Lamp Position:	4
Background Correction	BC On
Standard 1	10.00 µg%
Standard 2	20.00 µg%
Standard 3	30.00 µg%
Standard 4	40.00 µg%
Reslope Rate	300
Reslope Standard No.	2
Reslope Lower Limit	75.0%
Reslope Upper Limit	125.0%
Recalibration Rate	400
Calibration Algorithm	New Rational
Cal. Lower Limit	20.0%
Cal. Upper Limit	150.0%
Workhead Height	0.0 mm
Total Volume	25 µL
Vol. Reduction Factor	1
Bulk Conc.	40.00 µg%
Bulk Vial No.:	51
Makeup Vial No.:	52
Modifier 1 Mode	Co Inject
Modifier 1 Vol.	5 µL
Pre Last Dry Step	4
Injection Rate	1
Modifier 1 Pos.	54

Tabela 3: Rampa de Aquecimento para Chumbo

Step	Temp (C)	Time (s)	Flow (L/min)	Gas Type	Read	Signal Storage
1	85	5.0	3.0	Normal	No	No
2	95	40.0	3.0	Normal	No	No
3	120	20.0	3.0	Normal	No	No
4	120	20.0	3.0	Normal	No	No
5	300	8.0	3.0	Normal	No	No
6	450	7.0	0.5	Normal	No	No
7	480	8.0	0.5	Normal	No	No
8	480	5.0	3.0	Normal	No	No
9	490	2.0	0.0	Normal	No	Yes
10	2600	1.1	0.0	Normal	Yes	Yes
11	2600	1.0	0.0	Normal	Yes	Yes
12	2800	1.0	3.0	Normal	No	Yes

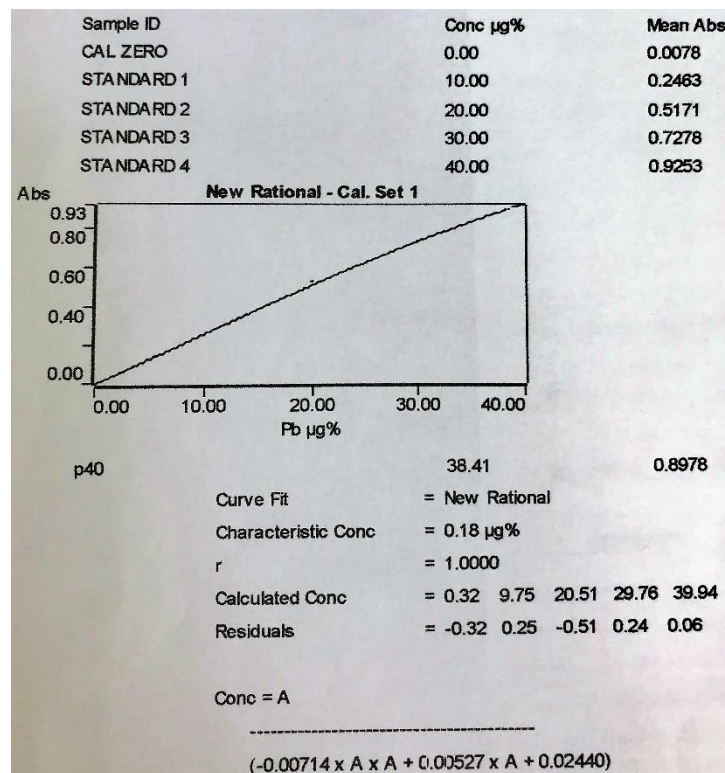


Figura 3: Curva de calibração para Chumbo no aparelho EspectrAA 640z

Tabela 4: Configurações Equipamento SpectrAA-640Z para Cromo

Method: Cr (Zeeman)	
Element Matrix:	Cr -
Instrument Type:	Zeeman
Conc. Units:	µg/L
Instrument mode:	Absorbance
Sampling mode:	Autonormal
Calibration mode:	Concentration
Measurement mode:	Peak Height
Replicates Standard:	1
Replicates Sample:	1
Expansion Factor:	1.0
Minimum Reading:	Disabled
Smoothing:	5 point
Conc. Dec. Places:	3
Wavelength:	357.9 nm
Slit Width:	0.2 nm
EHT:	313 volts
Lamp Current:	7.0 mA
Lamp Position	1
Background Correction	BC On
Standard 1	5.000 µg/L
Standard 2	10.000 µg/L
Standard 3	20.000 µg/L
Reslope Rate	100
Reslope Standard No.	2
Reslope Lower Limit	75.0%
Reslope Upper Limit	125.0%
Recalibration Rate	200
Calibration Algorithm	New Rational
Cal. Lower Limit	20.0%
Cal. Upper Limit	150.0%
Workhead Height	0.0 mm
Total Volume	20 µL
Sample Volume	20 µL
Vol. Reduction Factor	1
Bulk Conc.	20.000 µg/L
Bulk Vial No.:	51
Makeup Vial No.:	52

Tabela 5: Rampa de aquecimento para Cromo.

Step	Temp (C)	Time (s)	Flow (L/min)	Gas Type	Read	Signal Storage
1	85	5.0	3.0	Normal	No	No
2	95	40.0	3.0	Normal	No	No
3	120	10.0	3.0	Normal	No	No
4	1000	5.0	3.0	Normal	No	No
5	1000	1.0	3.0	Normal	No	No
6	1000	2.0	0.5	Normal	No	Yes
7	2600	1.2	0.5	Normal	Yes	Yes
8	2600	2.0	3.0	Normal	Yes	Yes
9	2600	2.0	0.0	Normal	No	Yes

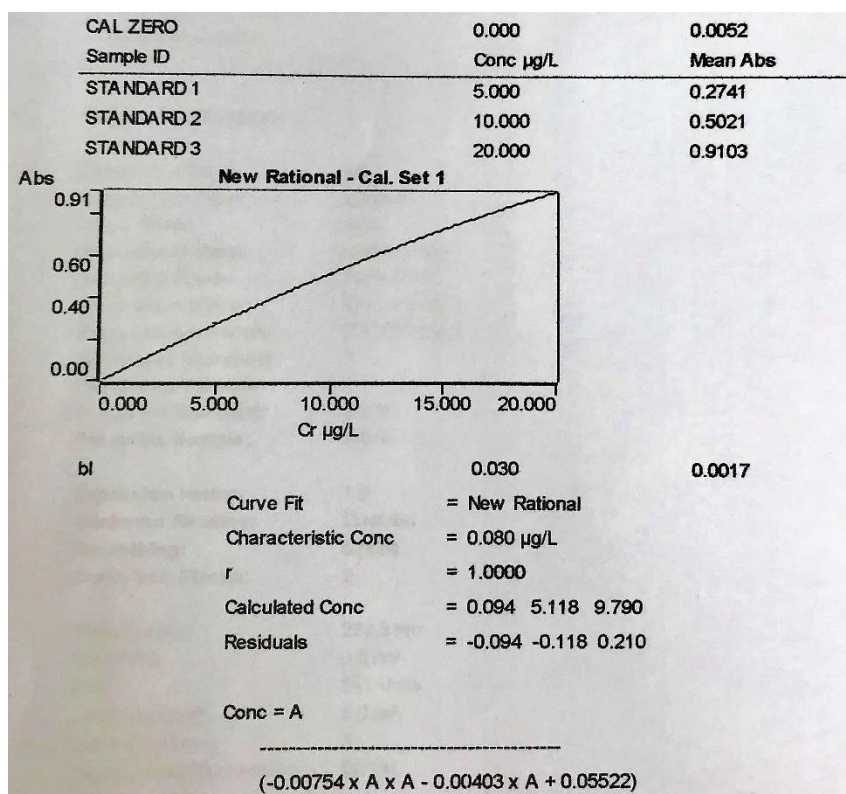


Figura 4: Curva de calibração para Cromo no aparelho EspectrAA 640Z.

Atualmente, este equipamento com estas rampas de aquecimento e condições metodológicas são utilizadas, validadas e certificadas no Setor de Metais e Doenças Raras do Laboratório de Pediatria, o chumbo sanguíneo, por exemplo, pesquisa intoxicações crônicas (Saturnismo) e doenças neurometabólicas, como procedimentos de rotina do HCFMRP-USP.

Para o Pb participa-se do exame de Proficiência PEP-Pb sangue do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo/Br e Cr do Programa Interlaboratorial de Controle de Qualidade PICC-Met U de Barcelona/Espanha; como programas de certificação do Setor de Metais. Os dois controles tem quatro rounds anuais e para estes testes sempre se faz um Certificante de valor conhecido junto com as dosagens que se requer no dia.

A curva de calibração é traçada semestralmente, no início do procedimento, com soluções padrões previamente preparados, em sistema de “*Bulk Concentration*”, solução de concentração maior posteriormente diluídas pelo próprio equipamento nas concentrações adequadas pré-estabelecidas para o traçado da curva.

O EAA utilizado para análise situa-se em ambiente *clean* equipado com filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air Filter) localizado na sala 208 do Laboratório. A “Sala Limpa” é classificada para ISO 7 com classe de 10.000 partículas. O controle da quantidade de partículas dentro da sala passa por Certificação e Classificação semestral. A limpeza diferenciada do ambiente é preconizada e realizada na sala em quetão.

3.2.3. Preparo Prévio das Amostras

Antes de aferir os oligoelementos presentes nas amostras de LH, constatou-se que seria preciso realizar um preparo prévio tanto para as amostras B quanto C. O processamento do leite no EAA sob a forma *in natura* (sem nenhum preparo prévio) não foi possível devido às interferências detectadas na queima, provavelmente pela viscosidade, quantidade de açúcares, proteínas e gorduras da amostra, etc. Não conseguiu-se interpretar os gráficos destes resultados e supôs-se que as interferências detectadas estariam relacionadas à alta concentração de lactose e lipídeos que teriam impregnado no tubo de grafite durante o processo de pirólise da amostra.

Desta forma, foram testados preparos prévios envolvendo a digestão das amostras em condições de alta temperatura e pressão proporcionadas por processos em Bombas de Teflon. É importante relatar que em todos os preparos, as amostras foram feitas em duplicatas para maior confiabilidade nos resultados obtidos.

Figura 5: Bomba de Teflon.



Seguiu-se os seguintes procedimentos:

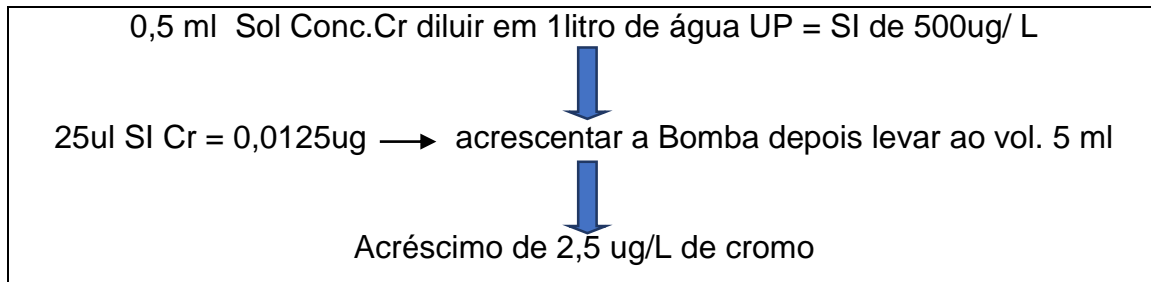
I)

- As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e depois colocadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos, para facilitar dissolução das gorduras.
- Sonicadas (Sonicador THORNTON) para maior homogeneização por 10 minutos.
- Pipetado 1 mL de amostra de LH e 1 mL de HNO₃ suprapur dentro de Bomba de Teflon, na capela de exaustão.
- As bombas com a mistura de LH+ HNO₃ foram deixadas em temperatura ambiente (24°C) por período (*overnight*) 12h.
- Alocação das bombas em Estufa de Esterilização e Secagem (Olidecz) a 80°C por 8 horas.

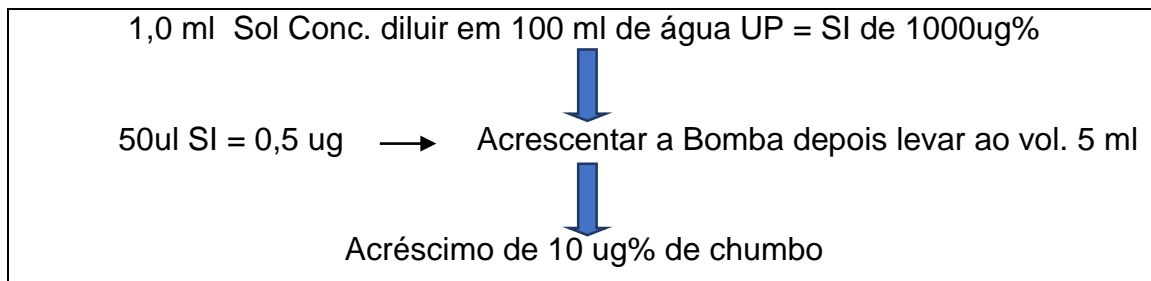
- Após resfriamento das bombas em temperatura ambiente, foram abertas em capela de exaustão utilizando-se luvas de nitrila. O conteúdo foi passado para balão volumétrico utilizando-se pipetas de transferência. Posteriormente foram ressuspensos em balões volumétricos de vidro de 10 mL com água ultrapura 1:10.
- 1,5ml do conteúdo do balão volumétrico foi passado para eppendorf e o restante foi armazenado em tubos de polietileno em duplicata de cada bomba, todos devidamente identificados com número da amostra.
- Os eppendorfs foram centrifugados em microcentrífuga a 13.000 rpm por 10 minutos.
- 1 mL do material sobrenadante foi passado para copetes os quais foram colocados no EAA para análise.

II)

- As amostras foram descongeladas, em geladeira (retiradas de um dia para outro) ou em temperatura ambiente, posteriormente colocadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos
- Sonicadas por 10 minutos.
- Diluídas 1:2 (1 mL de amostra de LH mais 1 mL de HNO₃ suprapur) e acrescidas de solução padrão de Cr e Pb, preparadas a partir de Soluções Standards (padrões concentrados) destes, em Bomba de Teflon, na capela de exaustão para verificar a recuperação do metal passado pelo procedimento da amostra.
- Preparo das soluções intermediárias para recuperação de padrão:
 - ✓ **Cromo** - Preparou-se uma solução intermediária (SI) à partir de uma Solução Concentrada de “Chromium III atomic (Sigma- Aldrich)- absorption standard solution contains 1000ug/ml in 1%HCl”.



- ✓ **Chumbo** - Preparou-se uma solução intermediária (SI) de 1000 µg% a partir de uma Solução Concentrada de Lead Standard for AA (Sigma- Aldrich) de 1000 mg/L.



- As bombas com a mistura de LH+ HNO₃+ Solução Padrão SI, foram deixadas em temperatura ambiente (24°C) *overnight*
- Alocação das bombas em estufa a 80°C por 8 horas
- Após resfriamento das bombas em temperatura ambiente, foram abertas em capela de exaustão utilizando-se luvas de nitrila. O conteúdo foi passado para balão volumétrico utilizando-se pipetas de transferência. Posteriormente foram ressuspensos em balões volumétricos de vidro de 5 mL com água ultrapura.
- 1,5 mL do conteúdo do balão volumétrico foi passado para eppendorf e o restante foi armazenado em tubos de polietileno em duplicata de cada bomba, todos devidamente identificados
- Os eppendorfs foram centrifugados em microcentrífuga a 13.000 rpm por 10 minutos
- 1 mL do material sobrenadante foi passado para copetes os quais foram colocados no EAA para análise

III)

- As amostras foram descongeladas em geladeira ou em temperatura ambiente para posterior banho-maria a 37°C por 10 minutos
- Sonicadas por 10 minutos.
- As bombas com a mistura de 1ml LH+ 1ml HNO₃ suprapur foram deixadas em temperatura ambiente (24°C) por período *overnight*
- Alocação das bombas em estufa a 80°C por 8 horas
- Após resfriamento das bombas em temperatura ambiente, elas foram abertas em capela de exaustão utilizando-se luvas de nitrila e seu conteúdo foi passado para balão volumétrico utilizando-se pipetas de transferência para posteriormente serem ressuspensos para volume total de 5 mL com água UP (diluição 1:5)
- 1,5 mL do conteúdo do balão volumétrico foi passado para eppendorf e o restante foi armazenado em tubos de polietileno em duplicata de cada bomba, ambos devidamente identificados
- Os eppendorfs foram centrifugados em microcentrífuga a 13.000 rpm por 10 minutos
- 1 mL do material sobrenadante foi passado para copetes os quais foram colocados no EAA para análise.

IV)

- As amostras foram descongeladas, em geladeira (retiradas de um dia para outro) ou em temperatura ambiente, posteriormente colocadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos
- Sonicadas por 10 minutos.
- Realizados e identificados quatro tipos diferentes procedimentos a cada:
 - 1 mL de leite+ 1 mL de HNO₃ + 100 ul de TRITONX-100
 - Preparo Opcional III: 1 mL de leite + 1 mL de HNO₃
- As bombas foram deixadas em temperatura ambiente (24°C) por período *overnight*
- Alocação em estufa a 80°C por 8 horas
- Após resfriamento das bombas em temperatura ambiente, elas foram abertas em capela de exaustão utilizando-se luvas de nitrila e seu

conteúdo foi passado para balão volumétrico utilizando-se pipetas de transferência e posteriormente ressuspensos para volume total de 5 mL com água UP (diluição 1:5).

- Seguiu-se um protocolo diferenciado para armazenamento,
 - Da metade das amostras acrescidas de TRITON, $\frac{1}{4}$ foram transferidos 1,5ml para tubo de vidro e armazenadas em tubo de vidro;
 - Ao outro $\frac{1}{4}$ foram transferidas 1,5 mL para eppendorf e o restante armazenado em tubo de polietileno;
 - Metade das amostras SEM o acréscimo de TRITON foram $\frac{1}{4}$ transferidos 1 mL para tubo de vidro e o restante armazenado em tubo de vidro;
 - O outro $\frac{1}{4}$ foi transferido 1,5 mL para eppendorf e o restante armazenado em tubo de polietileno.
- As amostras só foram centrifugadas imediatamente antes da análise para posterior transferência de 1 mL do sobrenadante para copetes devidamente identificados de acordo com o modo de preparo prévio e análise em EAA.

Este último procedimento, que envolveu preparos diferentes, foi realizado na tentativa de minimizar a formação de grumos, que foram observados nos preparos anteriores, no momento da diluição. Uma vez que o vidro fornece menor adesão que o polietileno, sua utilização poderia diminuir ou eliminar a presença dos grumos impregnados na parede dos tubos de polietileno. Com o mesmo intuito, o uso do detergente neutro TritonX100 poderia ser capaz de desengordurar com maior propriedade a viscosidade lipídica dos leites e a água morna colaboraria com a melhor solubilização das gorduras.

3.3. Análise estatística

Dado a natureza de “Projeto Piloto” deste estudo, a baixa disponibilidade de amostras excedentes de LH para o desenvolvimento de um procedimento de mensuração de Cr e Pb no LH, não foi realizado cálculo amostral nem aplicado testes estatísticos sob os resultados obtidos.

4. Resultados

Foram analisadas 42 amostras, para a detecção da concentração de Chumbo e Cromo, por EAA FG 640Z, sendo 21 amostras de leite humano Baseline e 21 amostras de leite humano Concentrado.

Diferentes preparos prévios foram realizados (os detalhes foram descritos em Materiais e Métodos), na tentativa de exclusão de interferências, como a presença de pequenos grumos após o processo de digestão e diluição; além da obtenção de resultados mais homogêneos nas leituras das dosagens em duplicatas.

Os devidos cálculos foram feitos de acordo com as diluições prévias das amostras e diluições padronizadas pelo equipamento. Todas as amostras foram lidas no aparelho em duplicata para posterior cálculo da média das leituras. As amostras que tiveram diferenças com relação a presença de grumos, banho maria e valores muito discrepantes entre elas não tiveram as médias calculadas.

As Tabelas 6 e 7 mostram os resultados das leituras feitas para o Chumbo.

Tabela 6: Leitura de Chumbo em amostras de Leite Humano Baseline.

Amostra Baseline	Resultado (ug%)	Tipo de preparo prévio
1B	2,10	I
2B	2,31	I
3B	2,89	I
4B *	1,23	III
4B	0,94	III
4B BM	1,04	III
5B *	1,17	III
6B	2,43	III
6B	4,83	III
6B rep (vidro)	2,54	III
7B	1,04	III
8B *	0,49	III
8B BM	1,11	III
9B*	0,87	III
9B* rep	2,34	III
9B	2,63	III
10B*	2,90	III
11B *	1,63	III
12B	0,69	III
12B BM	0,58	III
12B *	0,29	III
13B	2,57	III
14B*	2,12	III
14B	3,92	III
15B *	1,30	III
16B	2,12	III
16B	17,19	III
17B*	3,76	III
17B	1,73	III
18B *	0,62	III
19B *	0,40	III
19B BM	0,29	III
20B *	0,59	III
20B BM	0,72	III

*: presença de grumos; rep: repetição; BM: banho-maria
I: Diluição 1:10
III: Diluição 1:5

Tabela 7: Leitura de Chumbo em amostras de Leite Humano Concentrado.

Amostra Concentrada	Resultado (ug%)	Tipo de preparo prévio
1C	2,38	I
2C	1,51	I
3C	1,53	I
4C*	0,47	III
4C BM	0,51	III
5C*	0,66	III
6C*	1,55	III
7C*	1,70	III
8C	2,67	III
9C	0,39	III
9C*	1,63	III
9C BM	0,33	III
10C*	5,78	III
10C	2,11	III
11C*	1,29	III
12C*	0,39	III
13C*	1,15	III
13C BM	1,84	III
14C	2,33	III
15C*	3,19	III
16C*	0,28	III
16C	1,77	III
17C*	1,15	III
17C*	3,61	III
18C*	0,42	III
19C*	1,79	III
19C BM	4,43	III
20C*	1,97	III
20C BM	2,17	III

*: presença de grumos; rep: repetição; BM:

banho-maria

I: Diluição 1:10

III: Diluição 1:5

Em paralelo, foram realizadas leituras das amostras para detecção de Cromo no leite humano; os resultados obtidos constam nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8: Leitura de Cromo em amostras de Leite Humano Baseline.

Amostra Baseline	Resultado (ug/L)	Tipo de preparo prévio
1B	2,20	I
2B	2,89	I
3B	0,07	I
4B BM	0,38	III
5B*	1,05	III
5B	1,21	III
6B	2,65	III
7B	1,69	III
7B*	2,26	III
8B BM	1,95	III
9B	5,67	III
10B	4,97	III
11B	1,06	III
11B*	0,90	III
12B BM	1,49	III
12B*	2,63	III
13B*	2,46	III
13B*	22,33	III
14B*	2,43	III
14B	3,27	III
15B*	0,96	III
15B	1,40	III
16B	2,05	III
17B*	14,42	III
17B	2,31	III
18B*	1,22	III
18B	1,09	III
19B*	1,52	III
20B BM	4,51	III
20B *	3,72	III

*: presença de grumos; BM: banho-maria

I: Diluição 1:10

III: Diluição 1:5

Tabela 9: Leitura de Cromo em amostras de Leite Humano Concentrado.

Amostra Concentrada	Resultado (ug/L)	Tipo de preparo prévio
1C	2,05	I
2C	1,73	I
3C	3,67	I
4C BM	2,41	III
5C*	0,80	III
6C*	2,53	III
6C*	2,09	III
7C	2,45	III
8C BM	2,17	III
9C*	2,85	III
9C	1,66	III
10C	3,20	III
11C	0,61	III
11C*	1,89	III
12C BM	1,26	III
13C	1,81	III
13C*	2,24	III
14C*	5,81	III
14C* rep	2,60	III
14C*	28,98	III
15C	1,45	III
16C*	2,48	III
16C	2,44	III
17C*	13,77	III
17C* rep	1,37	III
18C*	1,55	III
19C*	4,10	III
20C BM	4,37	III
20C *	1,69	III

*: presença de grumos; rep: repetição;

BM: banho-maria

I: Diluição 1:10

III: Diluição 1:5

As tabelas 10 e 11 mostram os resultados obtidos com a presença e ausência de acréscimo do oligoelemento nas amostras.

Tabela 10: Leitura de concentração de Chumbo em Leite Humano Baseline e Concentrado com acréscimo de padrão de chumbo.

Amostra	Resultado (ug%)
1B	3,69
1B+ Pb	18,62
2B	2,67
2B+ Pb	19,45
1C	11,42
1C+ Pb	41,67
2C	6,57
2C+ Pb	20,10

B: Baseline; C: Concentrado; Pb: Chumbo

Tabela 11: Leitura de concentração de Cromo em Leite Humano Baseline e Concentrado com acréscimo de solução padrão de cromo.

Amostra	Resultado (ug/L)
1B	3,33
1B+ Cr	3,90
1C	6,60
1C+ Cr	6,64
2B	2,54
2B+ Cr	5,75
2C	2,25
2C+ Cr	3,07

B: Baseline; C: Concentrado; Cr: Cromo

As tabelas 12 e 13 demonstram os diferentes procedimentos tentados para eliminação de alguns interferentes.

Tabela 12: Leitura de concentração de Chumbo em Leite Humano Baseline e Concentrado com preparo prévio IV.

Amostra	Resultado (ug%)
21B Triton	1,60
21B Triton – Vidro	3,27
21B Opc III	1,41
21C Triton	5,98
21C Triton – Vidro	3,72
21C Opc III	1,36
21C Opc III - Vidro	1,91

B: Baseline; C: Concentrado; Opc III: Preparo Opcional III

Tabela 13: Leitura de concentração de Cromo em Leite Humano Baseline e Concentrado com preparo prévio IV.

Amostra	Resultado (ug/L)
21B Triton*	1,85
21B Triton- Vidro*	6,07
21B Opc III	2,05
21B Opc III -Vidro	2,05
21C Triton*	2,46
21C Triton*	23,88
21C Triton* rep	18,82
21C Triton- Vidro*	6,30
21C Opc III	1,27
21C Opc III - Vidro	6,95

B: Baseline; C: Concentrado; rep: repetição
Opc III: Preparo Opcional III

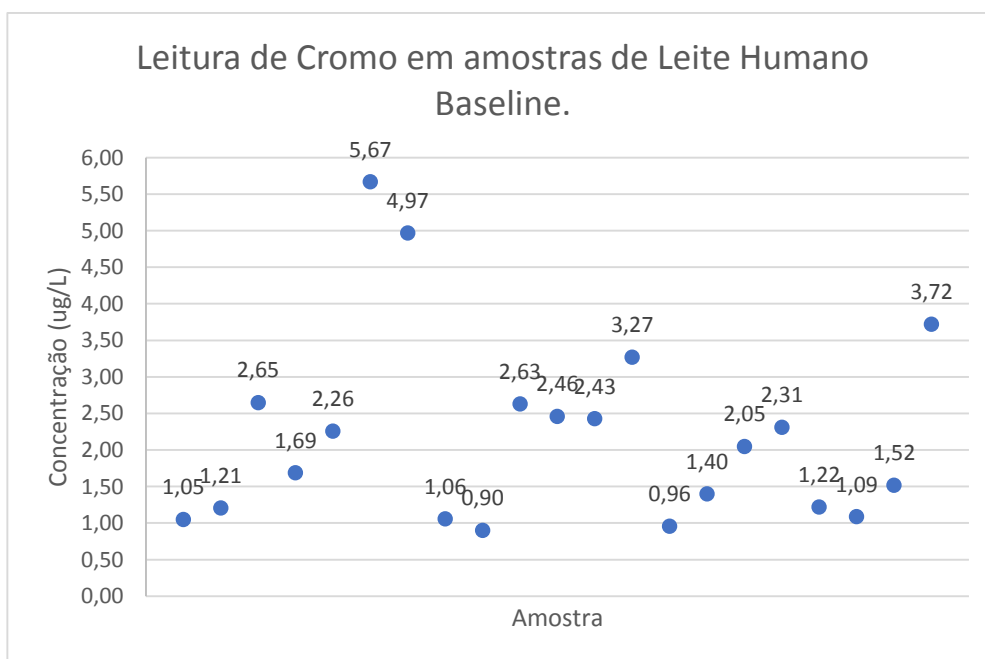
5. Discussão

5.1. Cromo

Existem poucos relatos na literatura acerca da quantificação de Cr em LH. Um dos mais recentes encontrados até o momento é Cocho e colaboradores, realizado na Espanha em 1991. Nele, diferentemente dos experimentos executados aqui, as amostras de LH foram armazenadas em recipientes de polipropileno em vez de polietileno. Suas diluições foram realizadas em proporção 1:2 com uma solução modificadora de matriz, contendo nitrato de magnésio, TritonX-100 e ácido nítrico, enquanto o preparo

prévio proposto neste projeto baseou-se em uma proporção de amostra mais ácido nítrico e diluição posterior de 1:5 com água UP.

Apesar das diferenças quanto ao preparo prévio das amostras, Cocho et. al também quantificou o Cr em leite maduro com a técnica de espectrofotometria em forno de grafite e encontrou um *range* de valores que se aproxima dos resultados aqui apresentados. Seus valores de Cr variaram entre 0,27µg/L à 2,27µg/L, de forma semelhante às variações do atual estudo 90,50% estiveram entre 0,90 e 3,72 ug/L, representados no gráfico abaixo. Os resultados das tabelas 8 e 9 que não corresponderam à essa faixa de valores podem estar relacionados à contaminação das amostras em momento prévio à leitura em forno grafite, uma vez que, de acordo com Cocho et. al, uma das principais dificuldades em aferir Cr em leite é a elevada sensibilidade à contaminação e nossos leites passaram por várias fases de preparo além da amostra o da pasteurização no BLH e liofilização.



5.2. Chumbo

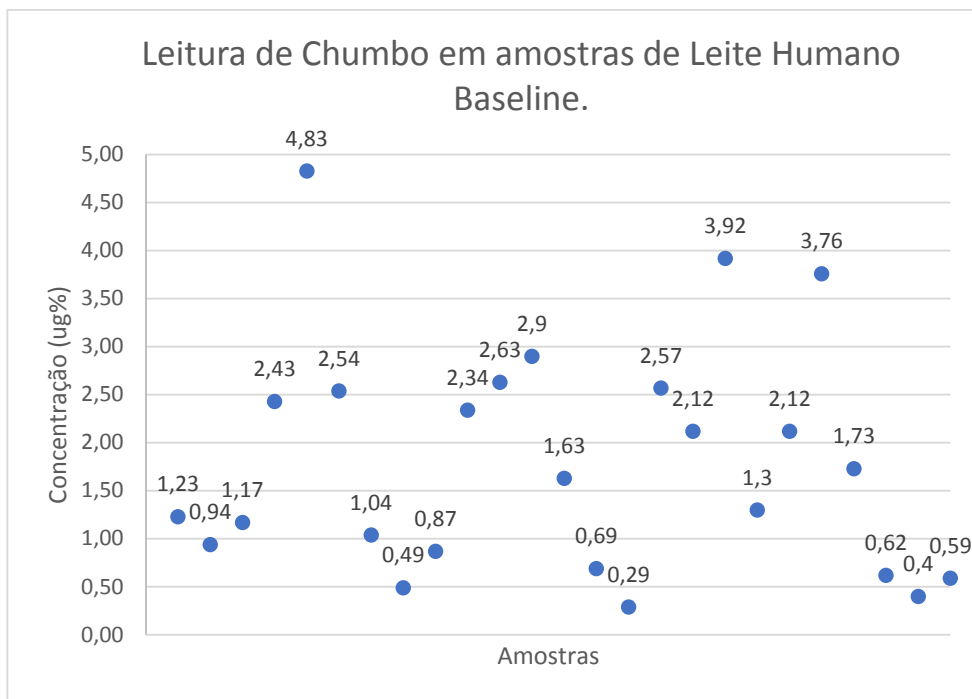
Um dos estudos mais recentes para quantificação de Pb no LH encontrado na literatura brasileira, com data de 2010, realizado por Koyashiki e colaboradores, que também utilizaram LH maduro para as aferições além das mesmas formas de armazenamento das amostras, com um número amostral maior e mais significativo. Diferentemente do presente estudo, sua metodologia

baseou-se na queima das amostras para posterior adição de HNO_3 a 5%, enquanto o procedimento proposto aqui baseou-se na digestão das amostras em bomba de Teflon com HNO_3 suprapur.

Além das diferenças de metodologia mencionadas, Koyashiki e colaboradores encontraram resultados que variavam entre $1\mu\text{g}\%$ (valor mínimo) e $8\mu\text{g}\%$ (valor máximo), valores coerentes com os apresentados nas tabelas 6 e 7 deste trabalho. No entanto, as diferenças podem ser atribuídas tanto às possíveis contaminações das amostras quanto aos métodos, equipamentos utilizados e população alvo de maior risco.

Semelhante ao PO proposto neste projeto, Ettinger e colaboradores, em estudo realizado no ano de 2006 em Boston, fizeram o preparo prévio de amostras de leite maduro com digestão em ácido nítrico sob condições de alta temperatura e pressão, porém a concentração de Pb em suas amostras foi medida em Espectrometria de Massa (ICP). Seu tamanho amostral foi consideravelmente maior e seus resultados variaram na faixa de $0,02\mu\text{g}\%$ (valor mínimo) e $0,8\mu\text{g}\%$ (valor máximo). A discrepância dos resultados apresentados entre este estudo e o aqui proposto pode estar relacionada com diferenças na população, uma vez que a localização geográfica e as condições de exposição ao metal são distintas. Fazendo uma revisão literária encontramos valores para populações sem exposição ocupacional (USA) ou valores referenciais de tolerâncias na legislação bem menores que brasileiros, de 0,20 a $0,50\text{ug}\%$.

Desta forma, ao comparar os resultados médios obtidos nas revisões, entre 0,20 e $1,68\text{ug}\%$ com os encontrados neste trabalho, constata-se que, estabelecemos um preparo prévio ideal para aferir Pb no LH e encontramos 88% das amostras com valores de $0,29\text{ug}\%$ à $2,90\text{ug}\%$, o que vem de encontro as literaturas.

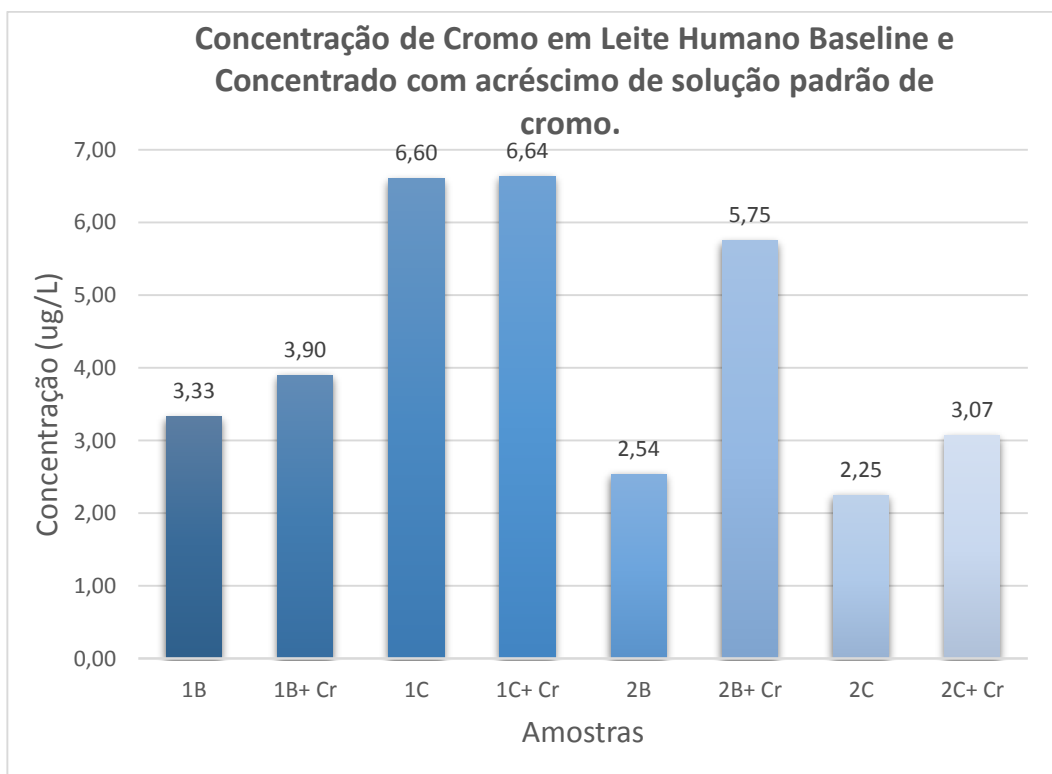
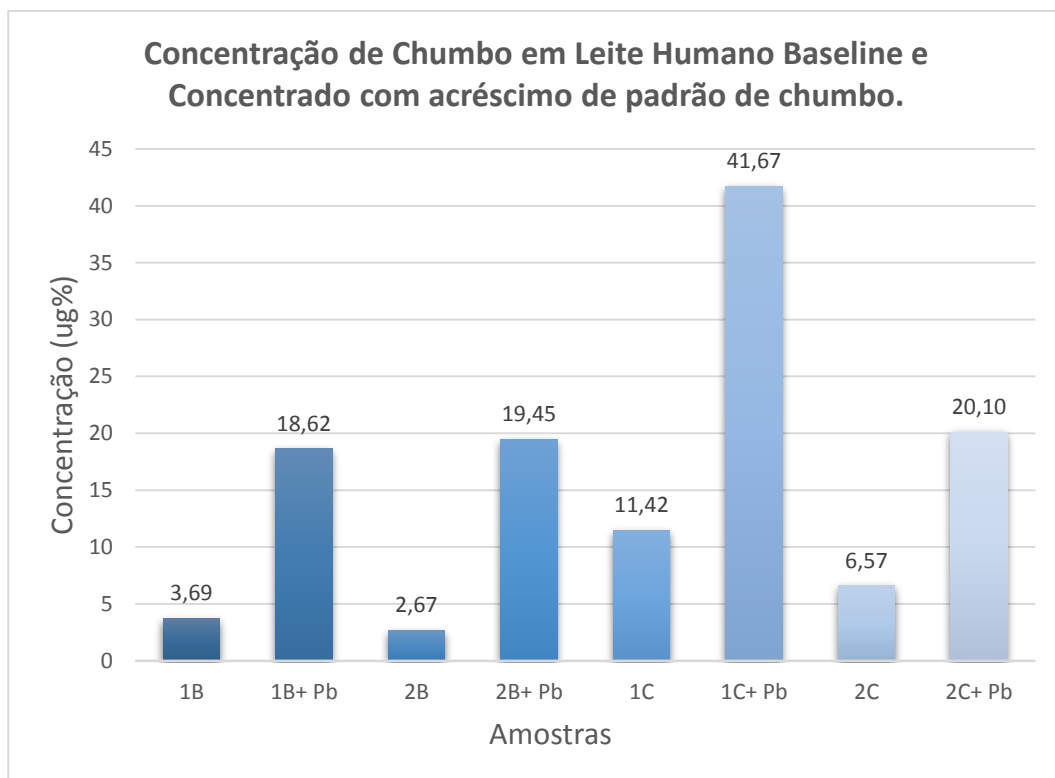


São necessários mais estudos acerca dos níveis de Cr e Pb em LH, com número amostral maior, para quantificação dos resultados e garantia de ausência de contaminação das amostras.

5.3. Considerações

Para se certificar que o PO aqui proposto é adequado para a quantificação de Cr e Pb em LH, foi realizado o preparo prévio II, em que se acrescentou uma SI de cada oligoelemento a fim de confirmar a recuperação de Cr e Pb nas amostras após a digestão em bomba de Teflon (recuperação de padrão). Logo, o objetivo dos acréscimos de concentração padrão foi conferir que a metodologia proposta é válida para a detecção dos oligoelementos nas amostras de LH.

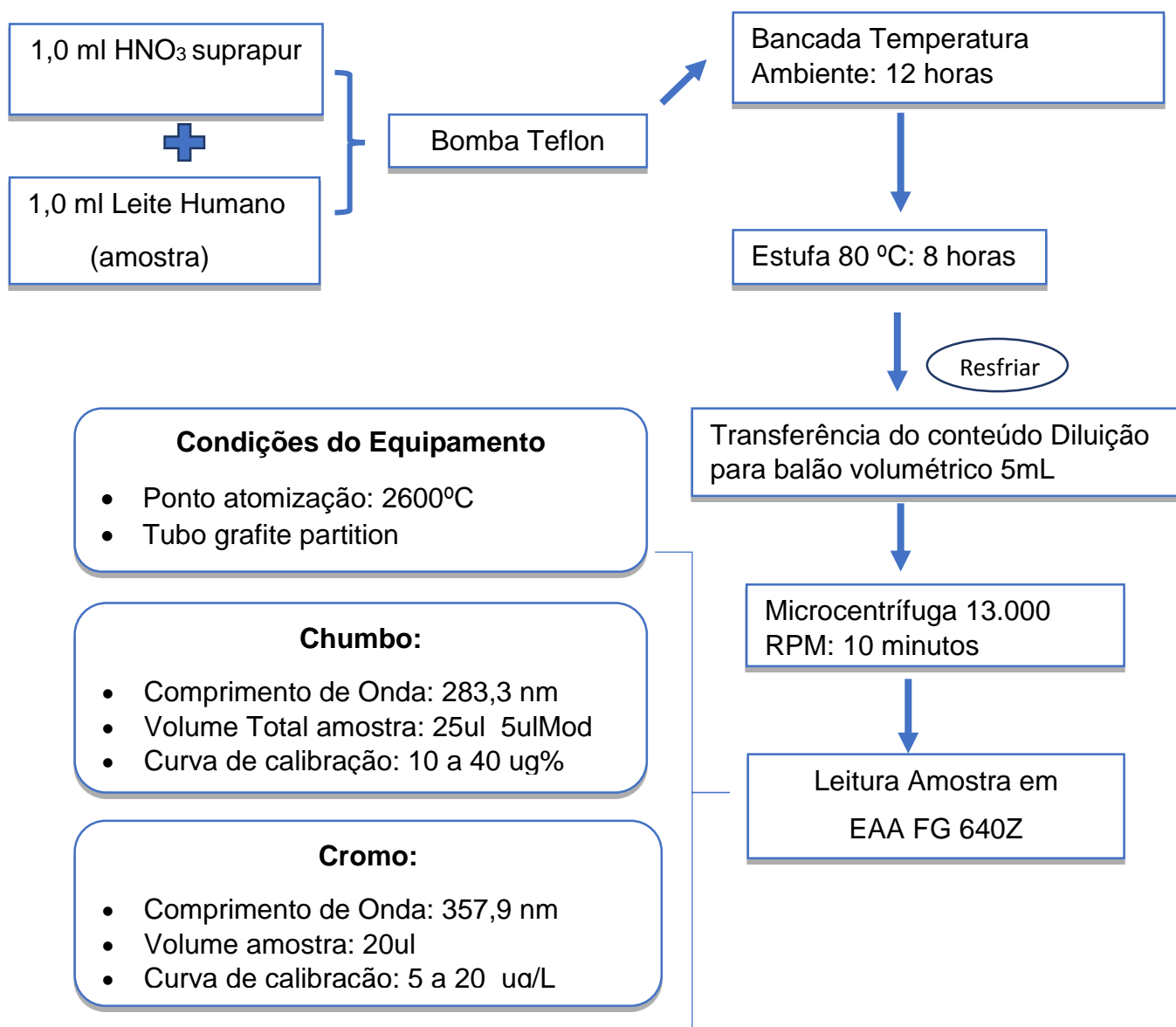
Os valores da Tabela 10 comprovam que a recuperação dos elementos foi adequada e, portanto, esta metodologia é válida. Os gráficos permitem uma melhor visualização da diferença entre as medidas sem e com acréscimo de SI nos leites baseline e concentrados.



6. Conclusão

O PO para dosagens dos contaminantes inorgânicos iônicos, Cr e Pb no LH deve ter como preparo prévio de amostras a digestão com HNO_3 suprapur em bombas de teflon na proporção 1:2 seguida com diluição para volume de 5 ml em H_2O UP e leitura no Espectrofotômetro de Absorção Atômica FG 640Z seguindo as rampas de aquecimento padronizadas, com ponto de atomização 2600°C para Cr e Pb, comprimentos de ondas específicos da LCO para Cr 357,9 e Pb 283,3 nm, em tubo de grafite partition, usando 20 μl de amostra do preparado para cromo com curva de calibração de padrões de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/L}$ e 25 μl para o chumbo, 20 μl da amostra e 5 μl de um modificador de matriz, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, baseando-se em curva de calibração de 10,20,30,40 $\mu\text{g}\%$.

Esquematização do Procedimento Operacional proposto para o LH:



7. Referências

AL-SALEH, I. et al. Birth outcome measures and maternal exposure to heavy metals (lead, cadmium and mercury) in Saudi Arabian population. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 2013.

BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human Milk Composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatr Clin North Am.**, v. 60, n. 1, p. 1–24, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Área Técnica de Saúde da Criança e Aleitamento Materno. **II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal**. 2009c, 108 p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude/area.cfm?id_area=1251> Acessado em 15 de julho de 2017.

CARDOSO, O. D. O. **O leite materno e as relações existentes entre as concentrações de metais pesados de diferentes matrizes ambientais** **O leite materno e as relações existentes entre as concentrações de metais pesados de diferentes matrizes ambientais**. [s.l.] Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de Sao Paulo, 2010.

CASEY, C. E.; HAMBIDGE, K. M. Chromium in human milk from American mothers. **British Journal of Nutrition**, p. 73–77, 1984.

CUNNINGHAM, G. Lead Toxicology and assessment in general practice. v. 36, n. 12, p. 1011–1013, 2007.

DEL CIAMPO, L. A.; RICCO, R. G. Aleitamento materno e meio ambiente. Ribeirão Preto: Editora e Gráfica Scala, 1998, 125p.

DOREA, J. G.; DONANGELO, C. M. Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. **European Society for Clinical Nutrition and Metabolism**, v. 25, p. 369–376, 2006.

ETTINGER, A. S. et al. Effect of Breast Milk Lead on Infant Blood Lead Levels at 1 Month of Age. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 14, p. 1381–1385, 2004.

ETTINGER, A. S. et al. Original Contribution Influence of Maternal Bone Lead Burden and Calcium Intake on Levels of Lead in Breast Milk over the Course of Lactation. **American Journal of Epidemiology**, v. 163, n. 1, p. 48–56, 2006.

KAC, G. et al. Breastfeeding and postpartum weight retention in a cohort of. p.

487–493, 2004.

KOYASHIKI, G. A. K. et al. Lead levels in milk and blood from donors to the Breast Milk Bank in Southern Brazil. **Environmental Research**, v. 110, p. 265–271, 2010.

MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. Scenarios Report. 2.nd. Washington: Island Press, 2004.

NASCIMENTO, L. F. C. Níveis de chumbo em colostro humano : um estudo no Vale do Paraíba Lead content in human colostrum : a study in the Paraíba Valley. v. 6, n. 1, p. 69–74, 2006.

NICKERSON, K. Environmental Contaminants in Breast Milk. v. 51, n. 1, 2006.

PEIRANO, M. M. F. Remoção de Metais Pesados no Tratamento Biológico - Sistema Biológico Tipo Lodos Ativados. Revista Gerenciamento Ambiental, São Paulo, v.24, p. 51-53, 2003.

PICCIANO, M. F. NUTRIENT COMPOSITION OF. v. 48, n. 1, p. 53–67, 2001.

PRATES, H.; SAS-PMSP, D. S. P. C. Vulnerabilidade socioambiental na metrópole paulistana : uma análise sociodemográfica das situações de sobreposição espacial de problemas e riscos sociais e ambientais *. n. Xi, p. 43–59, 2006.

PARADA, P. et al. Situação do aleitamento materno em população assistida pelo programa de saúde da família-psf. v. 13, n. 3, p. 407–414, 2005.

QUINTEROS, F. A. et al. In vivo and in vitro effects of chromium VI on anterior pituitary hormone release and cell viability. v. 218, p. 79–87, 2007.

RANA, S. V. S. Metals and apoptosis : Recent developments. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 22, p. 262–284, 2008.

REA, M. F.; PRÓ-AMAMENTAÇÃO, E. D. A. A. Benefícios da amamentação para a saúde da mulher e da criança : um ensaio sobre as evidências Benefi ts of breastfeeding for maternal and child health : an essay on the scientifi c evidence. p. 235–246, 2008.

SALNIKOW, K.; ROOM, E. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic and Chromium. **Chem Res Toxicol**, v. 21, n. 1, p. 28–44, 2009.

SPENCER, J. P.; MEMORIAL, C. Medications in the Breast-Feeding Mother. p. 119–126, 2001.