



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Carla Regina Bianchi Codo

Composição de eletrólitos e minerais e avaliação microbiológica do leite de lactantes a termo coletado antes e após a pasteurização e de leite cru de mães de recém-nascidos pré-termo à beira do leito.

Campinas

2017

Carla Regina Bianchi Codo

Composição de eletrólitos e minerais e avaliação microbiológica do leite de lactantes a termo coletado antes e após a pasteurização e de leite cru de mães de recém-nascidos pré-termo à beira do leito.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências na área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

**Orientador:** Prof. Dr. Sérgio Tadeu Martins Marba

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Carla Regina Bianchi Codo e orientada pelo Prof. Dr. Sergio Tadeu Martins Marba

Campinas

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

C648c Codo, Carla Regina Bianchi, 1971-  
Composição de eletrólitos e minerais e avaliação microbiológica do leite de lactantes a termo coletado antes e após a pasteurização e de leite cru de mães de recém-nascido pré-termo à beira de leito / Carla Regina Bianchi Codo. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Sérgio Tadeu Martins Marba.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Pré-termo. 2. Leite humano. 3. Amamentação. 4. Infecção hospitalar. I. Marba, Sérgio Tadeu Martins, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Composition of electrolytes and minerals and microbiological assessment in breast milk collected from term donors before and after pasteurization and from mothers of premature infants at the bedside

**Palavras-chave em inglês:**

Preterm infant

Milk, Human

Breast feeding

Cross infection

**Área de concentração:** Saúde da Criança e do Adolescente

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Sérgio Tadeu Martins Marba [Orientador]

Antonieta Keiko kakuda Shimo

Dalvani Marques

Solange Aparecida Rossini de Oliveira

Giselle Dupas

**Data de defesa:** 21-11-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Saúde da Criança e do Adolescente

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**CARLA REGINA BIANCHI CODO**

---

**Orientador PROF. DR. SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA**

---

## **MEMBROS:**

- 1. PROF. DR. SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA**
- 2. PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ANTONIETA KEIKO KAKUDA SHIMO**
- 3. PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. DALVANI MARQUES**
- 4. PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. SOLANGE APARECIDA ROSSINI DE OLIVEIRA**
- 5. PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. GISELLE DUPAS**

---

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

**Data: 21 de novembro de 2017**

Dedico este trabalho a todos os recém-nascidos pré-termo

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido Marcelo, por todo o apoio, auxílio e entendimento nas horas difíceis e nas ausências que a execução deste estudo acarretou.

Aos meus pais, Dalva A Bella Bianchi e José M. Bianchi (*in memoriam*), eternos professores que, com seus exemplos profissionais e de vida, me ensinaram e me tornaram o que sou hoje. Às minhas irmãs Cíntia e Carina; a Lilica; sobrinhas e sobrinho que tiveram que me aturar quando mal humorada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Tadeu Martins Marba, que me auxiliou muito na execução deste trabalho.

Aos profissionais do Instituto de Química da Unicamp, especialmente à Dr<sup>a</sup>. Rafaella Peixoto e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange Cadore, que me auxiliaram na análise das amostras de leite, com o apoio do mestrando Victor e da discente Tamara.

Aos profissionais do Banco de Leite e do Laboratório de Análises Clínicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Limeira (ISCML), que me auxiliaram, respectivamente, na coleta e na análise do BGBL (caldo bile verde brilhante lactose).

Aos profissionais da Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal da ISCML que, além de permitir a coleta de dados na UTIN, me apoiaram durante a mesma. Especialmente à Enfermeira Valdirene Valério, que sempre foi minha parceira nas conquistas dentro da Unidade, e à médica Soraia, que disponibilizou a unidade para a minha pesquisa.

Sem todos vocês o presente trabalho não teria ocorrido.

## RESUMO

**Introdução:** A alimentação enteral dos recém-nascidos pré-termo (RNPT) permanece um desafio, pois não se sabe ao certo o que é necessário para se ter uma nutrição que atenda a todas as suas necessidades de crescimento e desenvolvimento. O leite humano supre as necessidades dos RNPT nas primeiras semanas de vida com relação aos fatores de proteção e crescimento com: conteúdo proteico; enzimático; energético e imunológico. Entretanto, após esse período, a oferta de nutrientes diminui, principalmente em relação à quantidade de fósforo, proteína e cálcio, sendo por vezes necessária a suplementação do leite com o acréscimo de nutrientes industrializados. Também há dúvidas sobre o seu componente bacteriológico na gênese de processos infecciosos neonatais. **Objetivo:** Verificar a composição de eletrólitos e minerais e realizar a avaliação microbiológica do leite de lactantes a termo antes e após a pasteurização e de leite cru de mães de recém-nascido pré-termo coletado à beira do leito. **Métodos:** Estudo descritivo de corte transversal. Foram dosadas concentrações de cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), sódio (Na) e potássio (K) em amostras aleatórias de leite humano nos três grupos. As amostras foram analisadas por mineralização ácida assistida por radiação micro-ondas e posteriormente por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e expressas em mg/L, com cálculo de médias e desvio padrão. Para a avaliação bacteriológica foi utilizada a técnica do BGBL, utilizada pela Rede de Banco de Leite. A comparação entre os grupos foi feita por análise de variância (ANOVA)/teste de Tukey. Nível de significância aceito de 5%. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp sob o número CAAE 35545314.4.0000.5404 e aprovado pela REBEC RBR- 7994vz e foi assinado o consentimento livre e esclarecido informado dos participantes. **Resultados:** Observou-se uma redução significativa dos teores de Ca ( $259,4 \pm 96,8$  x  $217,0 \pm 54,9$ ;  $p=0,003$ ), P ( $139,1 \pm 51,7$  x  $116,8 \pm 33,3$ ;  $p=0,004$ ) e K ( $580,8 \pm 177,1,4$  x  $470,9 \pm 109,4$ ;  $p<0,0001$ ) após a pasteurização. As amostras de leite cru colhidas à beira do leito apresentaram teores estatisticamente mais elevados de Na – 2 vezes - que o leite a termo de doadora. Ca e P só atingem a ingestão recomendada pela European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition se o leite materno for ofertado em volume maior do que 60 mL a cada 3 horas. Concentrações de magnésio não diferiram entre os grupos. Na avaliação do BGBL pode-se observar que o processo de pasteurização é efetivo e que aproximadamente 50% das amostras colhidas em beira de leito tiveram resultado positivo na avaliação do BGBL **Conclusões:** houve uma redução significativa de Ca, P e K nas amostras após pasteurização, e os valores de Na no leite cru coletado à beira do leito foram superiores àqueles pré-pasteurização. Quanto à análise microbiológica, a pasteurização se mostrou eficiente e a coleta na beira do leito apresentou elevada positividade no BLBG.

**Palavras-chave:** pré-termo, leite humano, amamentação, infecção hospitalar.

## ABSTRACT

**Introduction:** Enteral feeding of preterm neonates (PN) remains a challenge, because no one knows for sure what is required to have a nutrition that supplies all their needs for growth and development. Human milk supplies the needs of PN in the first weeks of their lives, regarding protection and growth factors such as: immunological, energetic, enzymatic and protein contents. However, after this period, the nutrient supplies decrease, mainly in relation to the amount of phosphorus, calcium and protein, being sometimes necessary supplementation of milk with the addition of nutrients. There are also doubts about the bacterial component on its genesis of neonatal infectious processes.

**Goal:** To verify the composition of electrolytes and minerals and to carry out the microbiological evaluation of the milk of full term infants before and after pasteurization and raw milk of mothers of preterm babies collected at the bedside. **Methods:** descriptive cross-sectional study. Concentrations of calcium (Ca), phosphorus (P), magnesium (Mg), sodium (Na) and potassium (K) have been dosed in random samples of human milk in three groups. The samples were analyzed by acid mineralization assisted by microwave radiation and later by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma and expressed in mg/L, with average calculations bases and pattern deviation. For the bacteriological evaluation, the BRILA technique (Brilliant-green Bile Lactose) was used – also used by the Human Milk Bank Network. The comparison between the groups was made by analysis of variance (ANOVA)/Tukey test. Accepted significance level by 5%. The project was approved by the UNICAMP Research Ethics Committee under the registration number CAAE 35545314.4.0000.5404 and approved by REBEC RBR-7994vz and signed freely and willingly by the informed and consensual participants.

**Results:** we observed a significant reduction of the levels of Ca ( $259.4 \pm 96.8$  x  $54.9 \pm 217.0$ ;  $p = 0.003$ ), P ( $139.1 \pm 51.7$  x  $116.8 \pm 33.3$ ;  $p = 0.004$ ) and K ( $580.8 \pm 177.4$  x  $109.4$ ;  $p < 470.9 \pm 0.0001$ ) after pasteurization. Raw milk samples collected at the bedside presented statistically higher levels of On-twice as much of the term donor's milk. CA and P only reach the intake recommended by European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition if breast milk is offered in more than 60 mL every 3 hours. Magnesium concentrations did not differ between the groups. Through the BRILA assessment it can be observed that the process of pasteurization is effective and that approximately 50% of the samples taken at the bedside had a positive result in this evaluation system. **Conclusions:** there was a significant reduction of Ca, P and K in the samples after pasteurization and the values of NA in raw milk collected at the bedside were superior to those of pre-pasteurization. As for microbiological analysis, the pasteurization proved efficient and collection at the bedside presented high positivity in the BRILA system.

**Key-words:** preterm neonates; human milk; breastfeeding; hospital infection.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACT: alojamento conjunto tardio.

ANOVA: análise de variância.

AP: antes de pasteurizar.

BGBL: caldo bile verde brilhante lactose.

BL: beira de leite.

BLH: banco de leite humano.

Ca: cálcio.

ESPGHAN: European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition

ICP-OES: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry

IgA: imunoglobulina A.

ISCML: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Limeira.

K: potássio.

LH: leite humano.

LHO: leite humano ordenhado.

LMO: leite materno ordenhado.

Mg: magnésio.

Mg/L: miligramas por litro.

Na: sódio.

P: fósforo.

P: pasteurizado.

REBEC: Rede Brasileira de ensaios clínicos.

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada.

RDI: ingestão dietética de referência.

RNMBP: recém-nascido de muito baixo peso.

RN: recém-nascido.

RNPT: recém-nascido pré-termo.

RNT: recém-nascido termo.

SUS: sistema único de saúde.

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

UTIN: unidade de terapia intensiva neonatal.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos .....	12
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
3.1. Benefícios do leite humano .....	13
3.2. Imunologia e contaminação do leite.....	16
3.3. Composição do leite humano .....	18
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>20</b>
4.1. Desenho da pesquisa .....	20
4.2. Tamanho da amostra .....	20
4.3. Seleção de sujeitos .....	20
4.4. Variáveis e Conceitos .....	21
4.5. Coleta de dados: Técnicas, testes e/ou exames .....	22
4.6. Local do estudo .....	31
4.7. Processamento e análise de dados .....	31
4.8. Considerações éticas .....	32
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
5.1. Características da população do estudo.....	33
5.2. Resultados dos minerais presentes no leite .....	35
5.3. Resultado do volume de leite necessário para atender às necessidades nutricionais de eletrólitos e minerais do RNPT .....	40
5.4. Presença de microrganismos no leite humano: resultados do BGBL .....	42
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
6.1. Presença de minerais e eletrólitos no leite.....	44
6.2. Análise do volume de leite necessário para atender às necessidades nutricionais de eletrólitos e minerais .....	46
6.3. Análise do BGBL .....	48
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>56</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>61</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>70</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>92</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O cuidado nas unidades de tratamento intensivo neonatal evoluiu muito. Há cerca de vinte anos atrás a manipulação e a exposição à dor e estímulos nocivos era uma constante por parte da equipe. Os recém-nascidos eram manipulados de modo excessivo e não havia tecnologia apropriada aos cuidados em terapia intensiva. Atualmente várias mudanças ocorreram, não só por parte de equipamentos e materiais disponíveis, mas também por uma atenção mais humanizada permitindo que cada vez mais essas crianças sobrevivessem<sup>1-3</sup>.

Iniciar a alimentação enteral desses recém-nascidos é um desafio, pois não se sabe ao certo o que é necessário para ter uma nutrição que supra todas as suas necessidades de crescimento e desenvolvimento, como ocorria no ambiente intrauterino<sup>4</sup>. Isso requer da equipe um acompanhamento constante do crescimento e das repercussões da dieta no metabolismo. Muitas pesquisas foram realizadas nesta área, mas ainda existem questões não respondidas, como qual a quantidade e a qualidade necessárias de proteínas e energia, a serem ofertados ao RNPT<sup>5-8</sup>.

Sabe-se que uma alimentação adequada, obtida por meio da oferta de leite humano (LH), permite maior sobrevida ao RNPT. Da mesma forma, em médio e longo prazo, favorece o seu crescimento e desenvolvimento<sup>9</sup>. O LH contém fatores imunológicos, enzimas, como a lactoferrina, fornece energia, fatores de crescimento e quantidades adequadas de proteínas<sup>10</sup>.

Entretanto, o leite humano pode não ser suficiente para um crescimento e desenvolvimento adequados, necessitando de suplementação ou mesmo do uso de fórmulas lácteas. Em geral as crianças que nasceram prematuras apresentam déficit de crescimento, sendo que 50% relacionado à alimentação<sup>6,11</sup>.

A intolerância alimentar ainda é um outro ponto importante, pois pouco se sabe a respeito desse assunto. Muitos dados disponíveis sobre a alimentação do RNPT são antigos e foram obtidos em uma época em que o cuidado neonatal era realizado de outra maneira<sup>4</sup>.

Quanto mais precoce a oferta do leite proveniente das mães, mesmo em RNPT extremos, maior a proteção contra a enterocolite necrosante e processos infecciosos, maior a colonização do intestino com lactobacilos e fator *bífidus*, os quais aumentam a tolerância alimentar<sup>6-8,12</sup>.

O principal déficit de crescimento encontrado está relacionado ao desenvolvimento cerebral, que será prejudicado já nas primeiras semanas de vida<sup>6-8</sup>.

Isto ocorre porque o leite humano supre as necessidades dos RNPT nas primeiras semanas de vida, com relação aos fatores de proteção e crescimento, como: o conteúdo proteico, enzimático, energético e imunológicos. Entretanto, após algumas semanas, a oferta de nutrientes diminui, principalmente com relação à quantidade de fósforo, proteína e cálcio, sendo necessário o acréscimo de nutrientes industrializados para enriquecer o LH, ou mesmo o acréscimo do leite liofilizado, proveniente de bancos de leite humano (BLH), para esse enriquecimento<sup>10,13</sup>.

Um modo de suplementar o LH é acrescentar componentes do próprio leite humano. O processo de evaporação, ao qual é submetido o leite humano, permite concentrar seus nutrientes. Essa fórmula enriquecida pode ser adicionada ao leite, tornando-o mais adequado para a alimentação do recém-nascido de muito baixo peso (RNMBP). Neste processo podem ser acrescentadas gordura, proteína homóloga e lactose, em valores adequados a serem consumidos ao dia, de acordo com a necessidade da criança<sup>10</sup>.

Partindo desta breve revisão de literatura questiona-se: a administração de leite humano cru ordenhado no domicílio, antes de uma avaliação com relação à presença de microrganismos, traz riscos ao pré-termo? Quando o leite é ordenhado ao lado da incubadora existe risco de contaminação e oferta de um leite contaminado ao RNPT? Administrar um leite pasteurizado traz menos riscos? Existe diferença entre a composição do LH cru e a do LH pasteurizado? É necessária a complementação do LH? É preferível dar leite humano cru da própria mãe em detrimento do leite pasteurizado, com diminuição do custo?

Há, portanto, uma necessidade de aprofundar o conhecimento sobre a composição físico-química e a presença de contaminação do leite humano cru a ser ofertado ao recém-nascido pré-termo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Verificar a composição de eletrólitos e minerais e realizar a avaliação microbiológica do leite de lactantes a termo antes e após a pasteurização e de leite cru de mães de recém-nascido pré-termo coletado à beira do leito.

### 2.2. Objetivos específicos

- Comparar a concentração de fósforo, cálcio, magnésio, sódio e potássio do leite de lactantes a termo antes e após a pasteurização e de leite cru de mães de recém-nascido pré-termo
- Avaliar o volume necessário de leite a ser oferecido para o recém-nascido pré-termo para atender às suas necessidades nutricionais de eletrólitos e minerais.
- Avaliar e comparar a presença de microrganismos presentes no leite de lactantes a termo antes e após a pasteurização e de leite cru de mães de recém-nascido pré-termo.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Benefícios do leite humano

O leite humano não é meramente nutrição. Ele contém uma variedade de fatores que pode influenciar na sobrevivência e no desenvolvimento infantil. Quando o leite da própria mãe não está disponível, é recomendado, portanto, fornecer ao recém-nascido o leite obtido de uma doadora para auxiliá-lo a obter todos os nutrientes necessários ao seu bem-estar <sup>14</sup>.

O leite humano além de fornecer proteção contra doenças, também transfere nutrientes obtidos da alimentação da mãe e de suas reservas corporais, de acordo com as necessidades do RN, mostrando deste modo a sua eficácia. Também possui fatores bioativos não nutritivos. Os componentes do leite contribuem para o suporte nutricional da criança e para o desenvolvimento do sistema imunológico e cerebral, como também para a maturação e funcionamento de vários sistemas enzimáticos, e para o desenvolvimento e crescimento de órgãos e sistemas corporais <sup>14-16</sup>.

O leite materno deve ser o referencial nutricional dos recém-nascidos, ou seja, o modelo no qual outras formas de alimentação devem ser baseados com relação ao crescimento, à saúde, ao desenvolvimento e aos resultados esperados em longo e curto prazo. Isso devido ao leite humano fornecer uma ingestão equilibrada de elementos essenciais. Os RNPT que recebem leite materno têm um melhor desenvolvimento quando comparados com aqueles que receberam alimentação artificial <sup>15,17</sup>.

A alimentação de RNPT tem três objetivos principais: ajudar a criança a atingir o crescimento semelhante ao ambiente intrauterino, auxiliar na prevenção de enterocolite necrosante e infecções nosocomiais e melhorar, em longo prazo, o seu crescimento e desenvolvimento neurológico <sup>16</sup>.

Para que isto aconteça, a oferta de leite humano deve ocorrer o mais precoce possível para o RNPT. Esta oferta aumenta a sua tolerância alimentar, reduzindo o seu tempo de internação. Quando o leite da mãe não está

disponível, por taxas baixas de produção devido à estimulação inadequada das mamas, deve-se fornecer leite de doadoras. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o leite humano é a fonte preferida de nutrição para todos os lactentes e somente ele fornece todos os elementos necessários aos recém-nascidos<sup>16,18</sup>. Especula-se, entretanto, que a oferta de leite cru pode expor o RNPT à contaminação bacteriana, se o processo de pasteurização não ocorrer de modo efetivo<sup>18</sup>.

A oferta apenas de leite humano pode não promover um crescimento como o leite artificial, mas a oferta de leite artificial, por outro lado, não supre componentes existentes somente no leite humano. A fortificação do leite humano pode auxiliar na obtenção de um crescimento adequado e fornecer ainda os fatores essenciais do leite como: as imunoglobulinas, lactoferrina, lizosima, fatores de crescimento, enzimas, fatores anti-inflamatórios, citocinas e oligossacarídeos<sup>16</sup>.

O leite humano fornece aos recém-nascidos macronutrientes e micronutrientes, elementos estes considerados ideais para um desenvolvimento adequado. Entre os macronutrientes, podem-se citar os lipídeos, as proteínas e os hidratos de carbono. Sua composição varia de uma mãe para outra de acordo com seu estado nutricional e no decorrer de seu período de lactação, mas é muito semelhante entre uma mãe e outra. Os micronutrientes são as vitaminas, as enzimas e os minerais como o zinco, cobre, molibdênio, cobalto, iodo, cromo, flúor, ferro e selênio<sup>14,19</sup>.

A composição média de macronutrientes do LH é de aproximadamente 0,9 a 1,2 g/dL para proteínas, 3,2 a 3,6 g/dL para gordura e 6,7 a 7,8 g/dL para lactose<sup>14</sup>. Morgano et al.<sup>19</sup> citam que os macroelementos são constituídos pelo fósforo, potássio, magnésio, cálcio e sódio, entre outros.

A quantidade de micronutrientes no leite humano é muito variada, sendo amplamente influenciada pela dieta materna, etnia, período de lactação e do dia, além da composição genética do organismo. Esses componentes são importantes para a manutenção da saúde corporal, a recuperação do organismo, para um desenvolvimento correto e um crescimento adequado<sup>19</sup>.

Os RNPT apresentam baixo estoque de micronutrientes, podendo ser necessária a suplementação destes ao organismo por meio da oferta de leite humano fortificado. Esta oferta de micronutrientes proveniente do leite materno

é essencial devido à alta atividade metabólica em decorrência do crescimento acelerado que ocorre nesta fase da vida, como também pelo combate aos processos infecciosos<sup>19</sup>.

A oferta de oligoelementos é essencial para garantir o seu desenvolvimento adequado. Uma dose diária de elementos essenciais como ferro, cobre, zinco, selênio e iodo pode ser ofertada ao pré-termo. Entretanto, a dosagem certa para garantir o processo de crescimento e metabolismo ideais, ainda não foi determinada<sup>19,20</sup>.

O cálcio é o mineral mais abundante no corpo humano, e 99% dele está localizado nos ossos. Da 28<sup>a</sup> à 40<sup>a</sup> semana de gestação, sua presença quadruplica devido ao aumento da mineralização óssea. Os RNPT em geral perdem este período de mineralização. Deixar de fornecer ao pré-termo um alimento que atenda os requisitos nutricionais desse elemento pode levá-lo a desenvolver o raquitismo da prematuridade ou a osteopenia da prematuridade<sup>16</sup>. Uma ingestão de cálcio durante os primeiros anos de vida é fundamental para a prevenção do raquitismo e para o crescimento e desenvolvimento normais<sup>21</sup>.

A Academia Americana de Pediatria recomenda que as fórmulas para prematuros contêmham 140 a 160mg de cálcio por 100Kcal e 95 a 108mg de fosfato por 100Kcal. Entretanto, estas recomendações não levam em conta as características do intestino do RNPT nem a quantidade de gordura presente no alimento ou o tipo de leite oferecido. Dietary reference (DRI) recomenda 210 a 279mg/dia de cálcio para crianças até 12 meses<sup>16,21</sup>. O fósforo é absorvido por difusão passiva no jejuno de acordo com a sua concentração na dieta. Por outro lado, o cálcio é absorvido por mecanismos ativos e passivos<sup>16</sup>.

Cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês e zinco têm papel essencial no desenvolvimento infantil. Sua deficiência pode causar várias síndromes patológicas, entre elas o atraso de crescimento, fraturas ósseas, erupções dérmicas e um aumento da morbidade neonatal<sup>15</sup>.

Além da composição mineral e eletrolítica, o leite humano também possui elementos que são importantes para o desenvolvimento do sistema imunológico e da maturação do sistema digestório que serão abordados a seguir.

### 3.2. Imunologia e contaminação do leite

Fogleman<sup>16</sup> relata o efeito protetor do leite humano contra patógenos como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *rotavírus*, *E. coli enterotoxigênica* e *Camphylobacter*, e também a diminuição dos fatores de proteção do leite após o congelamento e processo de pasteurização.

Acreditava-se que o leite humano era estéril, entretanto, sabe-se agora que ele abriga uma comunidade microbiana que se altera de acordo com as características maternas como também ao longo da lactação<sup>14</sup>.

Serafini et al.<sup>18</sup>, em trabalho realizado sobre a contaminação de leite humano cru e pasteurizado, encontraram 136 cepas de microrganismos com possibilidade patogênica em 194 amostras de leite cru, representando um total de aproximadamente 70%. Nessas amostras, ainda foram encontrados leveduras e bolores. Nas amostras de leite pasteurizado, encontraram 50% de contaminação, ou seja, 73 cepas com possibilidade patogênica em 144 amostras.

Segundo Pessoto<sup>13</sup>, existem na literatura vários trabalhos que relatam a contaminação do leite cru a ser ofertado ao prematuro, com associação a episódios de septicemia nas unidades neonatais, trazendo risco ao recém-nascido. Esta contaminação inicial do leite humano ordenhado (LHO) reduz a qualidade do leite ofertado ao pré-termo, devido ao consumo, pelos agentes detectados no leite, de seus nutrientes e IgA. Quanto maior for a contaminação do leite antes da pasteurização menor será a qualidade do leite ofertado após o processo<sup>18</sup>.

A presença de imunoglobulinas no leite humano ordenhado retarda sua degradação pelos microrganismos primários, mas não impede que essa ocorra por contaminação secundária oriunda do ambiente, das doadoras e dos profissionais do BLH (Banco de Leite Humano). A sua oferta ao recém-nascido pré-termo pode trazer riscos devido a sua característica imuno-incompetente<sup>22</sup>.

Toda a organização do BLH é estabelecida para prevenir a contaminação do leite a ser oferecido ao recém-nascido. A primeira medida de segurança é a higienização das mãos dos profissionais a cada procedimento

técnico e das doadoras. O profissional deve estar paramentado com capote, gorro, máscara, luvas e óculos de proteção. A doadora deve estar com avental fenestrado (para acesso à mama) gorro e máscara e, se for manipular a mama deve estar com luvas de procedimento <sup>22</sup>.

Todos os utensílios usados para o processamento do leite devem ser esterilizados. Os frascos para coleta devem ser resistentes ao frio (-25°C) e ao calor (128°C). O material de que são compostos não deve interferir nem interagir com o leite, mesmo após ser submetido a todas as diferenças de temperatura <sup>22</sup>.

Toda doadora deve passar por avaliação clínica, e todo o leite que não seja da própria mãe deve ser pasteurizado antes de ser oferecido a outro recém-nascido, de acordo com a regulamentação brasileira RDC/Anvisa nº 171/2006 <sup>22</sup>.

Para preservar a qualidade bioquímica e microbiana do leite, ele deve ser transportado em cadeia de frio. O não respeito a esta norma pode aumentar significativamente a quantidade de microrganismos no leite, diminuindo a sua qualidade. O transporte do leite deve ser realizado em caixa térmica ou isopor com 3 recipientes de gelo reciclável para cada litro <sup>22</sup>.

Ao receber o leite, o BLH faz uma avaliação da sua qualidade. Primeiramente faz-se uma inspeção visual, descartando as embalagens ou o leite que contenha alguma sujidade. Deve-se estar atento à coloração normal do produto. O verde escuro, o marrom escuro ou o vermelho-tijolo devem ser descartados. Em seguida é avaliado o odor, o *off-flavor*, definido como cheiros não característicos. Nesses casos há a necessidade de descarte imediato do material<sup>22</sup>.

A acidez de Dornic indica, quando elevada, a presença de bactérias de origem primária (mãe) ou secundária (ambiente e profissional). Esta acidez aumentada é resultado da produção de ácido láctico, que acaba por diminuir a concentração de cálcio e fósforo. A acidez maior ou igual a 8ºD desclassifica o leite para o consumo <sup>22</sup>. É importante, também, avaliar o crematócrito, que é o método que determina o conteúdo energético do leite humano ordenhado.

O leite a ser ofertado ao recém-nascido deve ser livre de microrganismos em quantidade e qualidade, para não provocar danos à saúde da criança. Os microrganismos primários em geral estão presentes no leite e

são oriundos da corrente sanguínea materna. Os secundários, em geral estão presentes nos canais mamilares e no meio exterior<sup>22</sup>, portanto, são decorrentes de contaminação ambiental.

Para inativar os microrganismos, o leite deve ser aquecido a 62,5°C durante 30 minutos e depois resfriado a 5°C. Este processo não esteriliza o leite. Antes e após a pasteurização, o leite deve ser testado quanto à presença de microrganismos, utilizando-se a semeadura do leite em caldo bile verde brilhante lactose (BGBL) por 48 horas para detectar a presença de coliformes. Se estiverem presentes, o leite é descartado<sup>22,23</sup>.

Pode-se administrar o leite ordenhado cru ao RN pré-termo, desde que seja o leite exclusivo da própria mãe, refrigerado e no prazo máximo de 12 horas. O processo de ordenha deste leite deve ser acompanhado e muito bem orientado para evitar a sua contaminação e o possível prejuízo para a criança<sup>22</sup>.

### 3.3. Composição do leite humano

O leite de qualquer espécie contém concentrações elevadas de cálcio e fósforo, que aumentam a sua solubilidade de acordo com o aumento do pH do leite, ou seja, um pH de 6,7 a 6 aumentam em 20% o cálcio solúvel e em 15% o fósforo solúvel. O cálcio se liga às moléculas de caseína, aumentando a sua absorção. O aumento do pH deixa o cálcio em uma forma mais biodisponível. Biodisponibilidade é a quantidade de nutrientes disponível para absorção<sup>16</sup>. A lactose aumenta a absorção de cálcio e favorece a seu transporte passivo e ativo<sup>21</sup>.

O leite também contém componentes bioativos, que são definidos como os elementos que afetam os processos biológicos, tendo um impacto sobre a função ou a condição do corpo, ou seja, seu estado de saúde. Estes componentes são obtidos do plasma materno ou produzidos pelo epitélio da própria glândula mamária, permitindo que proteínas e lipídeos estejam ligados à proteína do leite<sup>14</sup>.

A absorção de um elemento químico tem correlação com sua biodisponibilidade, ou seja, a porção do seu montante total efetivamente utilizada para as funções do corpo depende fortemente da maneira e do

formato que o elemento químico tem quando ingerido. As análises de especiação, ou seja, determinar a quantidade de um mineral e verificar a sua absorção, são importantes para verificar a biodisponibilidade, a mobilidade, a reabsorção e o acúmulo dos elementos no organismo que podem levar a uma toxicidade. Apesar dos inúmeros trabalhos realizados nesta área a literatura sobre este assunto ainda é escassa<sup>15</sup>.

O tratamento térmico do leite acima de 90°C diminui a solubilidade do cálcio e do fósforo. Entretanto, a temperatura de 62,5° C usada no banco de leite faz com que as modificações sejam reversíveis<sup>16</sup>.

O congelamento e o armazenamento tendem a promover uma degradação do leite. O congelamento e descongelamento tendem a reduzir a capacidade bactericida. O processo de pasteurização reduz a composição e a função das proteínas<sup>14</sup>.

Quando a força iônica é aumentada pela adição de NaCl, existe uma ligeira diminuição do pH, que aumenta a solubilidade e a captação de cálcio pelo organismo do recém-nascido. Isto ocorre pela troca de cátions bivalentes com o cálcio, dissociando os pares de íons e tornando sua absorção maior<sup>16</sup>.

O cálcio, o fósforo e o magnésio são parcialmente ligados à caseína do leite. Um terço do cálcio, metade do fósforo e dois terços de magnésio estão na porção aquosa do leite. O cálcio está ligado à alfa-lactoalbumina, principal proteína do leite humano. Para que este cálcio seja absorvido e estar biodisponível, deve estar em forma solúvel, ou seja ionizado ( $\text{Ca}_2^+$ ) e ligado a uma molécula orgânica solúvel antes de poder atravessar a parede intestinal. Entretanto, esta absorção pode ser afetada pelas características do intestino e pelo tipo de dieta oferecida<sup>16,21</sup>.

O leite das mães de RNPT é rico em metais de elevado peso molecular, principalmente no colostro e leite de transição. Metais como cromo e selênio são importantes para o crescimento da criança, entretanto, sua concentração diminui no leite maduro<sup>20</sup>.

O colostro contém concentrações baixas de lactose, indicando que, nesta fase, o principal papel do leite humano é o de função imunológica. Contém ainda níveis elevados de sódio, cloro e magnésio e níveis baixos de potássio e cálcio<sup>14</sup>.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Desenho da pesquisa

Estudo de corte transversal.

### 4.2. Tamanho da amostra

Para o cálculo do tamanho da amostra, considerou-se a informação da prevalência de ocorrência de microrganismos no leite materno ordenhado (LMO) não pasteurizado (70,1%) e de LMO pasteurizado (50,7%) no estudo desenvolvido por Serafini et al.<sup>18</sup>. Considerando um nível de significância de 5%, com hipóteses de teste bilateral e teste qui-quadrado, para uma amostra com poder de 80%, cada grupo deveria conter 75 amostras ( $225 \div 3$ ) e, para 90%, cada grupo deveria conter 99 amostras<sup>24,25</sup>.

Para o cálculo do tamanho amostral considerando as dosagens de eletrólitos, utilizou-se o estudo desenvolvido por Morgano et al.<sup>19</sup>. Para o tamanho amostral foi estabelecido que as diferenças das médias não deveriam ultrapassar 1% do obtido no estudo, e, assim, cada grupo deveria ter no mínimo 17 amostras, a fim de propiciar um poder de teste de 80%.

Para o cálculo dos tamanhos amostrais foi utilizado o SAS software para Windows, versão 9.2.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa pelo número 35545314.4.0000.5404 (CAAE) e na REBEC RBR-7994vz.

### 4.3. Seleção de sujeitos

As lactantes incluídas no estudo eram mães de recém-nascidos a termo, doadoras do banco de leite humano, das quais se obtiveram as amostras antes e após a pasteurização. Para utilizar o leite doado não foi obtido o termo de consentimento, pois a coordenadora do setor autorizou a utilização deste leite, e também mães de RNPT das quais foram obtidas amostras de leite cru à beira do leito.

Critério de exclusão: não houve critérios de exclusão.

Para as mães de beira de leito, participantes do estudo, foi solicitado a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1).

#### 4.4. Variáveis e Conceitos

##### 4.4.1. Variável independente:

- **Tipo de leite.** Foram consideradas as seguintes categorias:
  - **Leite humano ordenhado em beira de leito (BL):** leite que a mãe de RNPT extraiu de sua própria mama, ao lado da incubadora ou na sala de amamentação da unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN), como também na unidade de cuidados intermediários canguru e no banco de leite humano.
  - **Leite humano antes da pasteurização (AP):** leite que a mãe de RNT retirou em ambiente doméstico seguindo a orientação da equipe da UTIN e do banco de leite.
  - **Leite humano pasteurizado (P):** leite que a mãe de RNT retirou em ambiente doméstico seguindo a orientação da equipe da UTIN e do banco de leite e foi selecionado para o processo de pasteurização.

##### 4.4.2. Variáveis dependentes:

- **Concentração de cálcio:** valor obtido do cálcio utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. Variável contínua expressa em mg/L.
- **Concentração de fósforo:** valor obtido do fósforo utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. Variável contínua expressa em mg/L.

- **Concentração de magnésio:** valor obtido do magnésio utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. Variável contínua expressa em mg/L.
- **Concentração de sódio:** valor obtido do magnésio utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. Variável contínua expressa em mg/L.
- **Concentração de potássio:** valor obtido do potássio utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. Variável contínua expressa em mg/L.
- **Presença de microrganismos:** foi pesquisada a presença de bactérias para verificar a presença de coliformes totais. Foram consideradas duas categorias: sim e não.

#### 4.5. Coleta de dados: Técnicas, testes e/ou exames

As amostras de leite foram obtidas das mães em diferentes períodos do dia, sendo algumas após a amamentação dos RNPT internados na UTI neonatal ou no banco de leite humano ou ainda na unidade de cuidados intermediário canguru, e outras sem que houvesse ocorrido a amamentação devido as condições clínicas da criança. Nesse caso, o leite era obtido por meio de extração manual, com paramentação de luva, máscara e gorro, ao lado da incubadora ou na sala de amamentação da unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN). A escolha por não determinar um peso de nascimento e IG se deu na tentativa de aproximar os resultados ao cenário real dentro das unidades neonatais na qual a oferta de leite não segue exatamente apenas uma idade gestacional.

O leite obtido no banco de leite foi proveniente de vários momentos e dias de coleta realizada em ambiente doméstico pelas mães doadoras que tiveram seus filhos a termo. Esse leite foi coletado seguindo as orientações dos profissionais do banco de leite humano da Santa Casa de Limeira que consistia na paramentação da mãe com gorro, luvas e máscaras descartáveis e cuidados quanto a higienização das mãos com sabão e água. Foi utilizada uma bomba de ordenha fornecida pelo hospital, como também os frascos de

vidro para a coleta do leite. A equipe da Santa Casa foi responsável por passar nas residências das doadoras e obter o leite coletado. Este foi transportado em caixa box de plástico, com gelo permanente e termômetro digital para o controle da temperatura, respeitando deste modo a cadeia de frio.

Ao chegar ao hospital, foi acondicionado em geladeira de leite cru. Antes do processo de pasteurização, este leite foi descongelado. Após o descongelamento, foi aberto na presença de chama acesa, cheirado e inspecionado quanto a possíveis intercorrências (presença de substância flutuante ou cabelo). Caso não houvesse sido encontrado nenhuma sujidade, foi realizado o processo de pasteurização.

O leite coletado foi submetido à análise de microrganismos por semeadura no teste de caldo bile verde brilhante lactose. Este teste foi realizado pelo Laboratório de Análises Clínicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Limeira, responsável pelas análises do banco de leite humano da referida instituição. Para a semeadura em caldo bile verde brilhante lactose, foram recolhidos 4 mL de leite de cada amostra que foram semeados em 10 mL da solução indicada. Após a semeadura, foi aguardado um período de 48 horas para a leitura do material, com testes realizados em 4 e 5%. Os resultados estão nas tabelas no Anexo 2.

Foram também coletados 4 mL de cada amostra para a quantificação dos teores de fósforo, cálcio, magnésio, potássio e sódio. As amostras de leite foram acondicionadas em tubos de plástico estéreis e armazenadas em freezer com temperatura controlada entre -4 a -8°C, e encaminhadas para análise no Grupo de Espectrometria Atômica (GEAtom) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em cadeia de frio. As amostras permaneceram congeladas até o momento das análises (FIG. 01).



FIG. 01: Frasco com leite congelado antes da análise no laboratório de química da Unicamp

Para a preparação das amostras para análise, o leite foi previamente aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$  em um banho de água (banho Maria) para o descongelamento e homogeneização das amostras (FIG. 02 e FIG. 03). As amostras foram, em seguida, agitadas manualmente e transferidas, com o auxílio de uma pipeta automática, para frascos de politetrafluoretileno (Teflon<sup>®</sup>). Quando não ocorria a diluição da caseína usava-se um vórtice de rotação baixa.



FIG. 02: amostras sendo descongeladas em banho- Maria

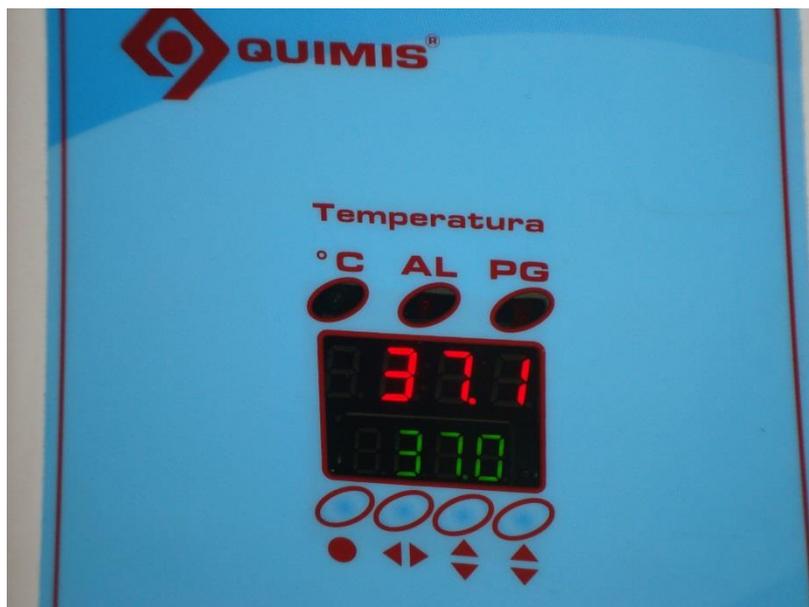


FIG. 03: temperatura para o degelo das amostras.

Em cada frasco, foi pipetado cerca de 0,5 g (FIG. 04) da amostra de leite, que foram pesados em balança eletrônica de precisão, de acordo com o tipo de amostra, ou seja, de beira de leite, antes e após a pasteurização. Cada amostra foi pesada em duplicata (FIG. 05) para posteriormente realizar os cálculos da concentração dos componentes.



FIG. 04: balança de precisão.

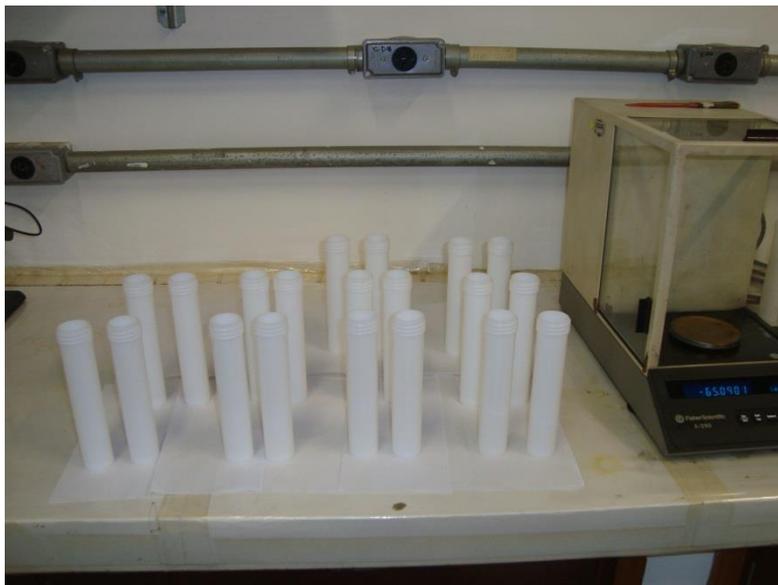


FIG. 05: amostras pesadas em duplicata.

Em seguida, os frascos foram transferidos para uma capela de exaustão (FIG. 06), onde foram adicionados 1,5 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ , 65 m/m, Sigma Aldrich), 1,5 mL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30% m/m, Merck) e 4,5 mL de água deionizada em cada um dos frascos contendo as amostras, os quais foram posteriormente fechados e colocados em um micro-ondas adequado para o preparo de amostra (ETHOS 1, Milestone) (FIG. 07) e submetidos ao programa de aquecimento (FIG. 08) apresentado na Tabela 01.

Utiliza-se a água deionizada pois ela é isenta de minerais e eletrólitos. A água destilada possui elementos que podem alterar a análise.



FIG. 07: micro-ondas.



FIG. 08: tela de aquecimento das amostras.

Tabela 01: Programa de aquecimento utilizado no micro-ondas para a preparação das amostras de leite.

Temperatura/°C	Tempo de rampa/min	Tempo de permanência/min
120	8	10
190	18	15

Após o resfriamento das amostras, os frascos foram para a capela de fluxo laminar, abertos e transferidos para tubos de plástico de 15 mL e o volume das amostras foi ajustado para 14 mL com água deionizada. Nesta fase a matéria orgânica do leite foi eliminada, ficando somente a sua composição química.

As amostras foram analisadas quanto aos teores de cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio em um espectromêtro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Perkin Elmer, 8300) (FIG. 09), capaz de determinar simultaneamente os elementos presentes na amostra. O cálcio, o fósforo e o potássio foram determinados utilizando a visão radial do equipamento, e o fósforo e o magnésio, a posição axial. As condições e os instrumentais utilizados para a análise do leite são mostradas na Tabela 02.



FIG. 09: ICP-OES.

Tabela 02: Condições instrumentais usadas no ICP-OES para a análise das amostras de leite.

Parâmetro	Valor
Potência/W	1400
Vazão do gás nebulizador/L min <sup>-1</sup>	0,70
Vazão do argônio/L min <sup>-1</sup>	0,5
Vazão de argônio/L min <sup>-1</sup>	15
Vazão de aspiração de amostra/mL min <sup>-1</sup>	1,0
Tempo de <i>delay</i> /s	45
Comprimentos de onda/nm	A: 317,933 nm; P: 213,617 nm; Mg: 280,271 nm; Na: 589,592 nm; K: 766,40 nm

Para a realização dos testes aqui indicados foi necessária, portanto, a coleta de 8 mL de leite de cada tipo, ou seja: a do LHO (leite humano ordenhado) na beira do leito (BL), a do frasco proveniente do ambiente doméstico obtido de mães doadoras de leite do BLH antes da pasteurização e após a mesma. No decorrer da coleta, muitas vezes obteve-se um volume maior do leite antes da pasteurização (AP), proveniente do volume destinado ao descarte do leite (volume excessivo ao processo de pasteurização), como também uma quantidade maior do leite proveniente da beira de leito. Isto permitiu que fosse determinada a presença de outros componentes do leite materno. Em outras amostras, entretanto, só foi possível obter o conteúdo mínimo necessário para realizar apenas a análise do BGBL, devido produção insuficiente de leite por parte da mãe.

Havia sido estabelecido que seriam coletadas 75 amostras de cada tipo de leite, entretanto, reveses durante a pesquisa resultaram em: 72 amostras do grupo BL: coleta de leite na beira do leito; 68 amostras do grupo AP: de leite coletado em domicílio para o banco de leite antes da pasteurização; 68 amostras do grupo P: leite pasteurizado. Totalizando 205 amostras, que foram testadas quanto à presença de microrganismos e à concentração de cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio.

As amostras BL foram colhidas em beira de leito das mulheres/mães dos RNPT internados na UTI Neonatal da Santa Casa de Limeira e daquelas em sistema de alojamento conjunto tardio (ACT) internadas na maternidade da ISCML, que após serem esclarecidas, assinaram do termo de consentimento livre e esclarecido. Para esta coleta foi utilizada a paramentação exigida pela rede de banco de leite humano que consistiu na utilização de touca, máscara descartável e luva de procedimento. A mama era exposta e eram desprezados os três primeiros jatos do leite. O leite coletado era direcionado direto em um copo descartável como o utilizado para a administração de leite no copinho. Entretanto, como as amostras iniciais deram BGBL positivo, decidiu-se pela coleta em frascos estéreis.

Como, ainda assim as amostras estavam com o BGBL positivo, decidiu-se a partir de então, realizar a assepsia da região da aréola, após o desprezo de três jatos de leite, com clorhexidina a 2% e gaze estéril. Esta nova técnica resultou em negatividade no teste do BGBL. Uma seringa

descartável de 5 mL agulhada foi inserida no interior dos tubos de ensaio para a coleta dos 4 ml de leite, que depois foram colocados nos frascos destinados ao BGBL.

A amostra do leite AP foi obtida mediante paramentação com capote descartável, touca, máscara, e luva de procedimento no interior do banco de leite da ISCML. A amostra era oriunda dos frascos de leite destinados ao processo de pasteurização. A coleta ocorreu ao lado de chama acesa, com a utilização de uma seringa de 5 mL estéril agulhada. Os 4 mL de leite obtido eram acondicionados no tubo de ensaio destinado à avaliação do BGBL, e depois mais 4mL ou mais eram aspirados para a determinação da concentração dos nutrientes propostos neste estudo. Os frascos de leite contendo 500 mL, de uma única doadora, eram então destinados ao processo de pasteurização, respeitando os preceitos e a preconização do Ministério da Saúde <sup>22</sup>.

As amostras coletadas após a pasteurização (P) foram obtidas respeitando a técnica preconizada para os BLH, respeitando a paramentação exigida e a chama acesa. Os testes do BGBL eram os mesmos das amostras que seriam destinadas ao consumo dos neonatos de risco da referida instituição. Além da amostra destinada ao BGBL, foram coletados mais 4 mL para a pesquisa da concentração de cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio.

As amostras, depois da pasteurização, dos indivíduos P06, P10, P13, P27, P45, P56 e P74 tiveram seus vidros quebrados durante o processo de pasteurização o que inviabilizou a coleta do BGBL, sendo colhida somente a amostra de leite para a quantificação dos componentes químicos das amostras P06, P10, P45, e a amostra P56 foi desprezada antes da pasteurização devido à presença de cabelo no interior do mesmo, novamente inviabilizando a análise do BGBL e química.

Com relação às amostras de Beira de Leite: a amostra BL05 não foi suficiente nem para a coleta do BGBL nem para o cálculo da análise química; as amostras BL 33 e BL34 foram suficientes apenas para a coleta do BGBL devido a volume de leite produzido ser insuficiente.

As amostras AP01, AP44, AP45, AP46, AP47, AP48, P13, P27, P46, P47, P48 e P64, foram perdidas no processo de transporte até o Instituto de Química.

#### 4.6. Local do estudo

O estudo ocorreu em um hospital privado, filantrópico, de nível terciário, que atende pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS), de convênios e particulares. Este hospital possui uma unidade de terapia intensiva neonatal com 20 leitos, oito dos quais se destinam aos cuidados intensivos, e doze aos cuidados intermediários.

A unidade possui em seu quadro de funcionários uma (01) enfermeira gerente, três (03) enfermeiras em cargo pleno, sete (07) enfermeiras especialistas assistenciais, vinte e oito (28) técnicos de enfermagem distribuídos nos quatro turnos de trabalho e dois médicos neonatologistas 24 horas por dia, em esquema de rodízio de plantões entre os membros da equipe. Conta ainda com uma terapeuta ocupacional, uma psicóloga, uma assistente social, duas fonoaudiólogas e uma equipe de fisioterapia.

A unidade neonatal faz parte da iniciativa hospital amigo da criança, do método canguru e da atenção humanizada ao recém-nascido e à família, possuindo o Banco de Leite Humano (BLH).

#### 4.7. Processamento e análise de dados

Para a análise das características da população do estudo foi utilizado o teste qui-quadrado para as variáveis categóricas e teste *t de Student* para as contínuas. Sendo as variáveis expressas em porcentagem e desvio padrão.

Na análise dos dados coletados foram comparadas os três tipos de amostra de leite e dois grupos de lactantes sendo: mães de RN a termo doadora de leite do banco de leite em amostras antes e depois da pasteurização e mães de RNPT com amostras de leite colhidas em beira de leito. Para comparar a concentração de nutrientes analisados nos três tipos de

leite, foram utilizados a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, para determinar a variabilidade entre as médias em cada grupo. Os mesmos cálculos foram utilizados para a análise dos resultados do BGBL.

Para o cálculo do volume de leite segundo as necessidades nutricionais de eletrólitos e minerais, foi utilizada a ingestão diária recomendada por ESPGHAN (European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition)<sup>26</sup>.

Para a análise dos dados, foi utilizado o programa Social Packhage for Social Sciences – SPSS na versão 20.0.

#### 4.8. Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Unicamp com CAAE 35545314.4.0000.5404, aprovação REBEC RBR-7994vz e obteve-se a concordância das mães para a obtenção das amostras de leite com a assinatura do TCLE (ANEXO 1).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Características da população do estudo

Os dados da população do estudo foram obtidos por meio da coleta de informações proveniente dos prontuários de atendimento das mães. A população do estudo foi dividida em duas categorias. A primeira é composta pelas mães com seus RNPT internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Limeira, e a segunda, pelas mães com filhos a termos e doadoras de leite do banco de leite da referida instituição.

Entre as mães doadoras de leite, a média da idade ficou em  $24,9 \pm 5,7$  anos. A grande maioria das mulheres nesta categoria tiveram parto cirúrgico, sendo o normal apenas em 26,7% da população.

Entre as mães da Unidade de Terapia Intensiva a idade variou de 16 a 41 anos, sendo a média de  $24,9 \pm 6,0$  anos. O peso de nascimento variou de 780 a 1999 gramas, sendo que a maioria dos neonatos estava localizado entre 1500 a 1999 gramas. Do mesmo modo que na categoria de mulheres doadoras de leite, a grande maioria foi submetida a parto cirúrgico contra 32,0% de parto normal.

A cor branca foi prevalente nas duas categorias, sendo de 89,6% para as mães doadoras e 84,6% para as mães de prematuros. A maioria é casada, sendo 76,4% nas doadoras e 61,5% no grupo de RNPT. Com relação ao nível de escolaridade, apenas 23,1% das mães de RNPT e 12,35% das mães doadoras tinham nível superior. A renda da maioria da população estudada ficou entre 2 e 5 salários mínimos, representando 76,9% das mães de RNPT e 90,5% das mães doadoras de leite (Tabela 03).

Tabela 03: Distribuição percentual das características demográficas e sociais das mães doadoras a termo e de RNPT

Variável	Mães doadoras	Mães de RNPT	p*
Idade em anos	24,9±5,7	24,9±6,0	0,980
Cor branca	89,6%	84,6%	0,606
Casada	76,4%	61,5%	0,261
Primigesta	54,8%	41,1%	0,098
Parto vaginal	26,7%	32,0%	0,473
Escolaridade (Nível superior)	12,3%	23,1%	0,303
Renda de 2 a 5 SM	90,5%	76,9%	0,156

Teste de qui-quadrado e t de Student

SM = salário mínimo

RNPT = recém-nascido pré-termo

p\* = p valor

## 5.2. Resultados dos minerais presentes no leite

Os resultados da composição dos nutrientes do leite, ou seja, as concentrações de Ca, P, Mg, Na e K obtidas em cada amostra em cada momento de coleta, constam nas tabelas no Anexo 3. Após as análises estatísticas utilizando estas amostras, chegou-se aos resultados descritos abaixo.

No presente estudo, o cálcio teve uma média de concentração de  $259,38 \pm 96,85$ mg/mL para as amostras antes da pasteurização e de  $228,24 \pm 54,99$ mg/mL para as amostras depois da pasteurização. Para as amostras colhidas em beira de leite o resultado foi de  $202,15 \pm 67,77$ mg/mL.

Comparando as concentrações de cálcio entre os diferentes tipos de amostras observamos diferenças estatisticamente significativas na comparação de APxP e APxBL ou seja, ocorreu uma redução estatisticamente significativa da concentração do cálcio do leite obtido antes da pasteurização quando comparado com após a pasteurização, como também o teor de cálcio presente no leite de mães de RNPT é estatisticamente menor do que o leite de mães de recém-nascido a termo (Tabela 04).

Tabela 04: Concentração de Cálcio segundo os diferentes tipos de amostra de leite, expressos por mg/mL

Tipo de leite	Média±DP	IC 95% da média	p valor
AP (68)	259,38±96,85	235,9 282,8	<b>APxP 0,003</b>
P (68)	228,24±DP54,99	203,6 230,3	PxBL 0,273
BL (72)	202,15±67,77	181,4 213,3	<b>APxBL &lt;0,0001</b>

AP=antes pasteurização; P=após pasteurização; BL=beira de leite; DP=desvio padrão; IC=intervalo de confiança

Para a análise do fósforo a média  $\pm$  DP para as amostras colhidas antes da pasteurização foi de  $139,10 \pm 51,74$  mg/mL. Para as amostras após a pasteurização, foi de  $116,78 \pm 33,32$  mg/mL. A concentração para as amostras colhidas em beira de leite foi de  $97,10 \pm 31,21$  mg/mL.

Comparando as concentrações de fósforo entre os diferentes tipos de amostras observamos diferenças estatisticamente significativas na comparação de APxP, PxBL e APxBL ou seja, as concentrações de fósforo do leite de mães de RNT foi maior do que a encontrada para as mesmas amostras após a pasteurização. O mesmo ocorrendo na comparação de leites PxBL e APxBL (Tabela 05).

Tabela 05: Concentração de Fósforo segundo os diferentes tipos de amostra de leite, expressos em mg/mL

Tipo de leite	Média $\pm$ DP	IC 95% da média	p valor
AP (68)	$139,10 \pm 51,74$	126,6 151,6	APxP 0,004
P (68)	$116,78 \pm 33,32$	108,7 124,9	PxBL =0,0010
BL (72)	$97,10 \pm 31,21$	89,8 104,4	APxBL <0,0001

AP=antes pasteurização; P=após pasteurização; BL=beira de leite; DP=desvio padrão; IC=intervalo de confiança

Com relação ao magnésio, obtiveram-se os seguintes valores: nas amostras antes da pasteurização  $45,72 \pm 13,04$  mg/mL, após a pasteurização  $42,24 \pm 10,65$  mg/mL e para as amostras de beira de leite  $47,27 \pm 17,98$  mg/mL.

Comparando as concentrações de magnésio entre os diferentes tipos de amostras observamos que não houve diferenças estatisticamente significativas (Tabela 06).

Tabela 06: Concentração de magnésio segundo os diferentes tipos de amostra de leite, expressos em mg/mL

Tipo de leite	Média±DP	IC 95% da média	p valor
AP (68)	$45,72 \pm 13,04$	42,6 48,9	APxP 0,335
P (68)	$42,24 \pm 10,65$	39,7 44,8	PxBL 0,097
BL (72)	$47,27 \pm 17,98$	43,0 51,5	APxBL 0,797

AP=antes pasteurização; P=após pasteurização; BL=beira de leite; DP=desvio padrão; IC=intervalo de confiança

Para os valores do sódio, obtiveram-se as seguintes concentrações: 337,70±317,90mg/mL, 275,07±261,34mg/mL e 704,04±417,47mg/mL respectivamente para leite antes e após a pasteurização e o coletado em beira de leite

Comparando as concentrações de sódio entre os diferentes tipos de amostras observamos que houve diferença estatisticamente significativa entre PxBL e APxBL. Nos dois casos foi observada concentração mais elevada do sódio nas amostras de beira de leite (Tabela 07).

Tabela 07: Concentração de sódio segundo os diferentes tipos de amostra de leite, expressos em mg/mL

Tipo de leite	Média±DP	IC 95% da média	Valor p
AP (68)	337,70±317,90	260,8 414,7	APxP 0,532
P (68)	275,07±261,34	211,8 338,3	<b>PxBL &lt;0,0001</b>
BL (72)	704,04±417,47	605,9 802,1	<b>APxBL &lt;0,0001</b>

AP=antes pasteurização; P=após pasteurização; BL=beira de leite; DP=desvio padrão; IC=intervalo de confiança

Comparando as concentrações de potássio entre os diferentes tipos de amostras observamos que houve diferença estatisticamente significativa entre APxP e APxBL. Em ambos os casos houve queda nos valores de potássio (Tabela 08).

Tabela 08: Concentração de potássio segundo os diferentes tipos de amostra de leite, expressos em mg/mL

Tipo de leite	Média±DP	IC 95% da média	Valor p
AP (68)	580,83±177,10	538,0 623,7	<b>APxP &lt; 0,0001</b>
P (68)	470,89±109,42	444,4 497,4	PxBL 0,153
BL (72)	515,69±133,00	484,4 546,9	<b>APxBL 0,020</b>

AP=antes pasteurização; P=após pasteurização; BL=beira de leite; DP=desvio padrão; IC=intervalo de confiança

### 5.3. Resultado do volume de leite necessário para atender às necessidades nutricionais de eletrólitos e minerais do RNPT

Após a determinação dos valores dos minerais e eletrólitos do leite humano, foi possível verificar a quantidade de leite necessária para atender às necessidades dos RNPT recomendadas pela ESPGHAN de 2010<sup>26</sup> (Tabela 09).

Para o cálculo da quantidade utilizou-se a dosagem obtida em mg/L multiplicado pelo o volume de leite a ser ofertado em mL fazendo a conversão em litro, obtendo-se a dosagem em mg para cada mamada. A partir deste cálculo para uma mamada, calculou-se a dosagem para o dia multiplicando o valor obtido pelo total de mamadas a serem ofertadas ao RNPT.

Tabela 09: Quantidade de eletrólitos e minerais em mg/mL de acordo com o volume de leite materno colhido de mães pré-termo à beira de leito calculada a partir das necessidades recomendadas pelo ESPGHAN para RNPT

Elemento	Ingestão recomendada (mg/dia)*	Teor médio determinado (mg/L)	Volume de leite ofertado por mamada (mL) a cada 3 horas						
			5	10	15	20	25	30	60
Ca	110 a 130	197,4	7,8	15,7	23,6	31,5	39,4	47,3	94,7
P	55 a 80	97,1	3,8	7,7	11,6	15,5	19,4	23,3	46,6
Mg	7,5 a 13,6	47,3	1,8	3,7	5,6	<b>7,5</b>	<b>9,4</b>	<b>11,3</b>	<b>22,7</b>
Na	63 a 105	704	28,1	56,3	<b>84,4</b>	<b>112,6</b>	<b>140,8</b>	<b>168,9</b>	<b>337,9</b>
K	60 a 120	515,7	20,6	41,2	<b>61,8</b>	<b>82,5</b>	<b>103,1</b>	<b>123,7</b>	<b>247,5</b>

\*Ingestão diária recomendada por ESPGHAN (European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) <sup>26</sup>. Em negrito destaca-se o volume necessário para obter a ingestão recomendada.

#### 5.4. Presença de microrganismos no leite humano: resultados do BGBL

Foram obtidas 72 amostras antes da pasteurização (AP), 47 delas, ou seja, 65,30% estavam contaminadas, com resultado positivo para 4 e 5% e 25 amostras, ou seja, 34,7% não apresentaram contaminação. Após a pasteurização foram obtidas 67 amostras das quais apenas uma (1) apresentou contaminação, representando 1,5%, e 66 amostras (98,5%) não apresentaram resultado do BGBL positivo.

Para as 73 amostras colhidas em beira de leite (BL), 37 ou seja, 50,7% apresentaram resultados do BGBL positivos tanto para 4% quanto para 5%. E 36 amostras deram negativo para contaminação.

Na comparação entre APxP, APxBL e PxBL houve diferença estatisticamente significativa sendo que antes de pasteurizar as taxas de positividade são mais elevada do que depois do processamento do leite, o mesmo ocorrendo na análise de AP x BL. Na comparação de PxBL, como era de se esperar, houve aumento da contaminação no leite de RNPT (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição percentual de material contaminado ou não, utilizando o caldo bile verde brilhante lactose, segundo o tipo de leite

Tipo de Leite	Contaminado (4%)	Contaminado (5%)	Não contaminado	p valor
AP (72)	47 (65,30%)	47 (65,30%)	25 (34,7%)	APxP <0,0001
P (67)	01 (1,5%)	01 (1,5%)	66 (98,5%)	P x BL <0,0001*
BL (73)	37 (50,7%)	37 (50,7%)	36 (49,3%)	AP x BL 0,0075

AP=antes pasteurização; P=após pasteurização; BL=beira de leite; DP=desvio padrão; IC=intervalo de confiança

As amostras de leite cru colhidas que apresentaram resultado positivo foram semeadas em placa de Ágar Chocolate com crescimento de bactérias gram positivas (*Estafilococos* e *Streptococos*). Não foi especificado para que amostras isto ocorreu e não se contou o número de colônias existentes.

Em 58 amostras de BL, representando 79,5% não foi realizada a assepsia e em 15, 20,5% foi realizado assepsia das mamas. Nas amostras nas quais não foi realizada a assepsia, 33 estavam contaminadas e 25 não contaminadas. Entre as amostras em que foi realizada assepsia com clorohexidina a 2%, 11 não estavam contaminadas e 4 estavam contaminadas por bactérias gram positivas, que fazem com que o resultado do BGBL seja positivo (Tabela 11).

Tabela 11: Resultado do BGBL na presença de assepsia nas amostras colhidas em BL

Assepsia	Contaminado	Não contaminado	P Valor
Com assepsia (15)	4	11	0.0459
Sem assepsia (58)	33	25	

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Presença de minerais e eletrólitos no leite

Diversos fatores podem influenciar a composição do leite, que é bastante variada principalmente quanto à presença de micronutrientes. Entre os fatores que podem afetar esta composição estão: o período da lactação, ou seja, se colostro, leite de transição ou maduro, a constituição genética da mãe, o período do dia e a alimentação. Além disso, pode variar de mulher para mulher e para a mesma mulher<sup>12,14,19,20,27-30</sup>. Por outro lado, Bates e Prentice<sup>30</sup> afirmam em seu estudo que a oferta de cálcio, ferro, zinco e cobre na dieta da mãe não afeta a concentração destes minerais no leite humano. No presente estudo, foi encontrada uma grande variação de concentração de nutrientes, como, por exemplo, na concentração de sódio, no leite colhido à beira do leito, que teve uma variação de quase três vezes (349,84 mg/mL a 996,70 mg/mL).

Braga e Palhares<sup>11</sup> não encontraram alterações significativas na composição do leite humano após a pasteurização, afirmando que os componentes do leite permaneceram inalterados. Entretanto, os teores de cálcio e de fósforo, não atingiram os níveis recomendados com relação à nutrição do recém-nascido pré-termo. No presente estudo, como já citado anteriormente, todos os elementos estudados tiveram uma redução estatisticamente significativa, com exceção do magnésio. Já Souza e Silva<sup>31</sup> encontraram uma redução na composição dos macro e dos micronutrientes após a pasteurização, indicando a necessidade da fortificação do leite para suprir as necessidades do RNPT. No presente estudo, quando se compara a concentração de Ca e P com as necessidades do RNPT, pode-se verificar que é necessário a complementação do mesmo no leite ofertado à criança (Tabela 01).

Bortolozzo et al.<sup>32</sup> observaram que os processos de armazenamento, pasteurização e congelamento reduzem os teores de nutrientes do leite humano. Além disso, o leite de mães de prematuros apresentou maiores teores de cálcio, potássio, sódio e zinco do que o leite de mães com leite maduro que tiveram parto em gestação a termo. No presente estudo, somente o sódio foi encontrado em teores mais elevados.

Underwood<sup>33</sup> também afirma que o leite de mães de RNPT contém mais sódio, gordura e proteína. Entretanto, a tendência com o passar das semanas é de queda de seus valores. Os teores de zinco e de cobre também são mais elevados, enquanto os teores de cálcio são menores, o que coincide com o observado neste estudo, no qual os teores de cálcio encontrados nas amostras após a pasteurização foram significativamente menores do que aqueles encontrados em amostras coletadas a beira de leite. Ballard e Morrow<sup>14</sup> também relatam que os processos de pasteurização e de estocagem podem afetar a composição nutricional do leite materno.

Morgano et al.<sup>19</sup> pesquisaram a composição mineral do leite maduro de mães doadoras, entre 25 a 35 dias de lactação. As amostras foram incineradas até a formação de cinzas brancas e a seguir foram diluídas em ácido nítrico e transferidas para balão volumétrico até completar o volume de 50 mL com água bidestilada. Não foi especificado, entretanto, se essa análise foi realizada antes ou depois da pasteurização. Os teores médios (mg/L) dos elementos encontrados foram:  $263,55 \pm 64,73$  para o cálcio,  $159,26 \pm 33,63$  para o fósforo,  $489,76 \pm 132,70$  para o potássio,  $207,21 \pm 149,62$  para o sódio e  $26,53 \pm 6,84$  para o magnésio.

Os valores para o cálcio, sódio, potássio e magnésio neste estudo foram maiores do que os encontrados no trabalho de Morgano et al.<sup>19</sup> para os leites obtidos de mães doadoras antes da pasteurização. Apenas os teores de fósforo que foram menores. Os teores de cálcio, fósforo e potássio, após a pasteurização, também foram menores do que os encontrados por Morgano et al.<sup>19</sup>, ao contrário dos teores de sódio e magnésio, que foram maiores. Para o leite coletado em beira de leite os teores encontrados neste estudo foram maiores para o cálcio e o fósforo e menores para magnésio, potássio e sódio em relação ao trabalho de Morgano et al.<sup>19</sup>.

No trabalho de Bocca et al.<sup>15</sup> os valores encontrados para o cálcio foram de  $307 \pm 11,8$  microgramas por mL em dados com distribuição normal. Esses dados são semelhantes a esse estudo, utilizando água deionizada. Para o magnésio os valores encontrados foram de  $0,03 \pm 0,002$ , valores bem abaixo dos encontrados no presente estudo.

## 6.2. Análise do volume de leite necessário para atender às necessidades nutricionais de eletrólitos e minerais

A recomendação nutricional da *European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN) em 2010 para prematuros indica que a oferta diária de cálcio deve estar entre 110 a 130 mg/dia <sup>26</sup>. Com relação ao cálcio, na dosagem obtida a média dos teores determinados nas amostras coletadas à beira de leite foi de 197,4 mg/L. Considerando-se esse valor médio, um recém-nascido teria que ingerir muito mais que 0,5 L de leite materno por dia para atingir os valores de ingestão recomendados pela ESPGHAN (Tabela 09) <sup>26</sup>.

Mesmo considerando o maior teor de Ca encontrado em uma amostra coletada em beira de leite (242,5 mg/L), a ingestão diária recomendada de cálcio só seria atingida com a ingestão de um alto volume de leite materno. Como o volume de leite ingerido por um recém-nascido é muito baixo, os teores de Ca encontrados nas amostras analisadas neste trabalho seriam insuficientes para garantir as demandas nutricionais dos pré-termos quanto à ingestão deste nutriente segundo as recomendações acima <sup>26</sup>.

Para o fósforo, a ingestão diária recomendada pela ESPGHAN é de 55 a 80 mg/dia. Considerando a média dos teores deste elemento encontrados em amostras coletadas à beira do leite (97,10 mg/L), também seria necessária a ingestão de um alto volume de leite pelos recém-nascidos, o que poderia indicar uma possível deficiência desse importante elemento para o desenvolvimento cerebral e ósseo <sup>12,26</sup>. Esse fato enfatiza a necessidade de enriquecer ou complementar o leite com esse elemento.

Para o magnésio, o valor de ingestão diário recomendado é de 7,5 a 13,6 mg/dia. Considerando a média dos teores encontrados neste trabalho (47,27 mg/L), a ingestão diária de 160 mL, ou seja a oferta de 20 mL de leite a cada três horas ao recém-nascido garantiria uma ingestão adequada deste nutriente. Já a concentração média de sódio encontrada foi de 704,04 mg/L e a ingestão diária recomendada é de 63 a 105 mg. Neste caso, a ingestão de 15 mL a cada três horas de leite pelo recém-nascido já seria suficiente para garantir as demandas nutricionais deste elemento. Para o potássio, a ingestão recomendada é de 60 a 120 mg/dia e o teor médio obtido neste estudo foi

515,7 mg/L, neste caso também a ingestão diária de 120 mL/dia, seria suficiente para uma ingestão adequada deste elemento (Tabela 09)<sup>12,26</sup>.

Trindade<sup>5</sup> observou que o leite produzido no primeiro mês de vida da criança, tanto de mães de bebês prematuros como de mães que tiveram filhos a termo, apresentam concentrações similares de cálcio e fósforo e afirma que os teores não seriam suficientes para promover a mineralização dos ossos de RNPT, sendo necessária a fortificação/suplementação do leite para suprir as deficiências que possam aparecer. Aqui se pode observar a necessidade de um volume maior de leite para suprir o recomendado, sendo, portanto necessário a complementação do leite materno ofertado.

O comitê da ESPGHAN 2010 recomenda a oferta de leite humano fortificado, quando necessário, para o pré-termo, devido à possibilidade de variação da composição do leite ao longo do dia e do período da lactação. Informa que a estocagem e a pasteurização alteram a composição do leite<sup>26</sup>. O mesmo foi observado neste estudo. Ocorreu uma redução da composição do leite após a pasteurização, mas os únicos componentes cuja dosagem não atinge o recomendado e devem ser acrescentados para enriquecer o leite são o cálcio e o fósforo.

A fortificação do leite humano, com o próprio leite humano processado, ou com proteínas do leite de vaca, tem propiciado um crescimento adequado do recém-nascido pré-termo<sup>34</sup>.

Catache e Leone<sup>35</sup> trazem o relato de vários estudos que apontam que a oferta de minerais, via leite materno, aos prematuros extremos é insuficiente, sendo necessária a complementação do leite principalmente com o fósforo, para evitar a osteopenia e o raquitismos da prematuridade. Recomendam a utilização de suplemento de cálcio e fósforo até a idade gestacional corrigida de 40 semanas, com suplementos do leite materno.

Há um consenso em relação à suplementação do cálcio e do fósforo, entretanto, os outros minerais, como já visto neste estudo (Tabela 09), estão em quantidade suficiente para as necessidades do RNPT.

Montjoux-Regis et al.<sup>36</sup> afirmam que a oferta de leite cru não aumentou a incidência de processo infeccioso e de enterocolite necrosante. Os prematuros que receberam leite cru de suas próprias mães tiveram inclusive um ganho de peso maior do que os que receberam leite pasteurizado de

doadoras. Isto pode se dar em decorrência da redução dos componentes do leite observada neste estudo após o processo de pasteurização.

A absorção e a biodisponibilidade de um dado elemento essencial na alimentação dependem fortemente da estrutura química específica deste elemento <sup>20</sup>. Estima-se que a média de absorção do cálcio e do fósforo varie entre 36 a 75% do que foi ingerido pelo pré-termo <sup>5</sup>. A ingestão de leite traz inúmeros benefícios, e, quando a mãe do RNPT não pode suprir esta necessidade, o leite deve ser obtido por meio de doadoras de leite <sup>31</sup>. A Academia Americana de Pediatria recomenda hoje que o leite ofertado ao pré-termo, seja o materno devido aos seus inúmeros benefícios <sup>33</sup>.

O leite da própria mãe é preferível ao leite de doadoras, pois o mesmo não sofre a diminuição de seus fatores de proteção e de nutrientes quando comparado com o leite doado após a pasteurização, conforme com o observado neste estudo. As mães de pré-termo devem ser incentivadas a ordenhar o seu leite com frequência para aumentar a oferta de leite, diminuindo assim, a necessidade de pasteurização. Entretanto, quando a produção de leite da mãe não é suficiente deve-se optar pela oferta de leite doado e adequadamente pasteurizado <sup>34</sup>.

### 6.3. Análise do BGBL

O Caldo bile verde brilhante lactose (BGBL) é a técnica usada e preconizada pela rede de bancos de leite brasileira para a análise da adequação do leite a ser ofertado ao recém-nascido após o processo de pasteurização. O teste detecta a presença de coliformes fecais presentes no leite que inviabilizam a oferta do mesmo. Entretanto, este teste não é realizado no leite cru da própria mãe a ser ofertado. Como também não existem muitos trabalhos sobre a análise do BGBL no leite cru, o que dificulta a discussão do presente estudo.

Em nossos resultados pode-se perceber que o processo de pasteurização da ISCML é efetivo na eliminação de bactérias do tipo coliformes no leite a ser ofertado ao recém-nascido.

Na avaliação do leite cru, foi visto que metade das amostras estavam contaminadas ou seja, BGBL foi positivo. Entretanto, não houve pesquisa

sobre qual microrganismo acarretou este resultado positivo, nem ocorreu contagem do total de microrganismos encontrados, por uma limitação funcional do laboratório no qual as análises ocorreram. Deve-se lembrar que esse leite não foi ofertado ao recém-nascido. O leite oferecido à criança passou pelo processo de verificação de qualidade com pesquisa de ausência de cheiro estranho e de objetos flutuantes antes de ser ofertado. As amostras colhidas pela pesquisadora foram destinadas somente para a pesquisa, como demonstrado neste presente estudo na descrição da coleta das amostras. Isto porque não é possível realizar a coleta do leite já porcionado, pois implicaria na diminuição do volume a ser ofertado ao RN da instituição do estudo.

Borges<sup>37</sup> realizou um estudo retrospectivo comparativo da avaliação da acidez Dornic e do teste de BGBL de amostras colhidas em domicílio e no BLH da instituição pesquisada. Ela separou 50 amostras colhidas em domicílio de mães doadoras de leite e 50 no ambiente do banco de leite, descartando as amostras que deram acidez acima de 8º D. As amostras foram submetidas ao processo de pasteurização e posteriormente foi realizado o teste do BGBL. Três amostras (6%) provenientes do ambiente doméstico e 2%, ou seja, uma amostra do BLH deu positiva para coliformes totais.

O resultado é diferente do presente estudo, pois as amostras analisadas no BLH eram provenientes tanto do domicílio quanto, uma minoria colhidas dentro do hospital. Na avaliação do resultado destas apenas uma deu positiva para coliformes totais, ou seja, 1,5%.

Araújo et al.<sup>38</sup>, entre abril de 2009 a dezembro de 2010, coletaram 430 amostras de leite humano cru congelado em domicílio e 4 mL de cada amostra foi inoculado no BGBL. Das amostras analisadas, 40 (9,3%) apresentaram contaminação por coliformes e 390 (90,7%) estavam dentro da norma estabelecida para o BLH. Portanto, valores bem abaixo do que foi observado neste trabalho.

Serafini et al.<sup>18</sup> coletaram 338 amostras de leite humano, sendo 194 de leite cru e 144 pasteurizado. As amostras foram semeadas em ágar sangue e ágar Mc Conkey. Das amostras de leite cru, 136 (70,1%) apresentaram contaminação, e, do pasteurizado, 73 (50,7%) tinham microrganismos patogênicos. Entretanto como os autores não avaliaram o resultado do BGBL, não é possível a comparação com o presente trabalho.

Novak et al.<sup>39</sup> analisaram 30 amostras de leite cru, após orientação sobre prática higiênica para as mães. As amostras foram congeladas em domicílio e encaminhadas para análise dentro das normas recomendadas pela rede de BLH. Das amostras analisadas, 16 apresentaram coliformes totais com contagem de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/mL. A presença destes, segundo os autores, sugere más condições higiênico-sanitárias indicando que este leite foi manipulado de modo inadequado. Os leites testados neste caso tinham alteração do *off-flavor*.

Quando comparado com o estudo atual pode-se perceber que a presença de resultado positivo é semelhante, entretanto, as amostras para análise neste trabalho foram obtidas pela própria pesquisadora, em ambiente hospitalar, respeitando todos os preceitos de paramentação e com desprezo dos 3 primeiros jatos de leite. Como não ocorreu a identificação do número de colônias, nem se pesquisou a presença de alguma outra bactéria, fica a dúvida de se a positividade do teste deve-se somente ao resultado para coliformes.

Neto et al.<sup>40</sup> analisaram 25 amostras de leite cru e 15 de leite pasteurizado. As mesmas foram colhidas em tubo de ensaio de 10 mL estéreis e encaminhadas para análise do BGBL a 2%. As amostras após a pasteurização não apresentaram contaminação, o que está de acordo com o observado neste trabalho, mostrando a efetividade do processo de pasteurização.

Em um estudo sobre a eficácia da orientação sobre as práticas higiênicas antes da ordenha para a redução de contaminação do leite coletado em domicílio, Silva et al.<sup>41</sup> analisaram a presença de microrganismos por meio do BGBL em dois grupos: o grupo A, antes da orientação e o grupo B, após orientação e acompanhamento prático da primeira ordenha. No grupo A, 8 (7,34%) das 109 amostras foram positivas na análise microbiológica, e no grupo B, 13 (8,33%) de 156 foram positivas na análise do BGBL após a pasteurização, não sendo considerada estatisticamente significativa a diferença entre os dois grupos. O estudo não relata se ocorreu pesquisa de outros microrganismos. Os valores foram superiores aos observados no presente estudo. Entretanto, pode-se perceber que a orientação não modificou

a presença de positividade no BGBL, o que pode indicar a presença de outros microrganismos no leite.

Moulin et al.<sup>42</sup> analisaram em temperatura ambiente, o desenvolvimento de bactérias no leite cru em 33 nutrízes, com coleta manual, após orientação de higiene rigorosa das mãos, mas não das mamas, sendo desprezados os três primeiros jatos, com coleta posterior de 40 mL em frascos de plástico previamente higienizados. O número de coliformes totais variou de zero a 15/mL, 72% das amostras (n=24) não apresentaram contaminação.

Nobre et al.<sup>43</sup> analisaram amostras de leite cru descartadas pelo BLH do hospital de Araguaí-TO pela semeadura de 1 mL de leite em placas de Petri. Das 66 amostras analisadas, 41 (62,12%) apresentaram presença elevada de microrganismos mesófilos. Isto sugere que a qualidade do leite sofre risco de alteração. Das amostras analisadas, 19 deram positivo para o teste do BGBL. Índice abaixo do que o encontrado no presente estudo.

Novak et al.<sup>44</sup> analisaram 837 amostras de leite humano ordenhado cru, destas 71 amostras estavam contaminadas com coliformes. Quando comparado com o estudo atual, percebe-se que este valor é bem menor aqui.

Os mesmos autores relatam que, durante o aleitamento diretamente ao seio, em geral não ocorre a transferência de microrganismos entre mãe e filho, provavelmente devido à baixa virulência e à baixa quantidade dos mesmos e pela presença dos fatores de proteção no leite humano<sup>44</sup>.

O controle da qualidade microbiológica do leite é importante, pois ele é oferecido a recém-nascidos com baixa resistência à infecção<sup>45</sup>. Faz-se necessária, portanto, a pesquisa de presença de microrganismos neste leite. Silveira et al.<sup>45</sup> encontraram 6 amostras de leite (7,5% do total de amostras pesquisadas em seu estudo) contaminadas: duas por *Staphylococcus sp* (32%); uma por *Staphylococcus aureus* (17%); e por *Streptococcus sp* (17%) e uma por *Escherichia coli* na mesma porcentagem. Entretanto os recém-nascidos que receberam esse leite foram acompanhados durante sete dias após a sua oferta e não desenvolveram processo infeccioso. Talvez isto tenha ocorrido, porque as bactérias encontradas fazem parte da flora normal da pele da mama.

Castro<sup>46</sup> realizou a pesquisa de microrganismos no leite cru em 60 amostras de 20 mL, acondicionadas em frasco estéril, com tampa,

transportadas até o laboratório da ESALQ (Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz) em cadeia de frio. As amostras foram obtidas do BLH da ISCML. Das amostras analisadas, 50% foram positivas para *Escherichia coli*; 75% para coliformes totais; 96,6% foram positivas para microrganismo aeróbios mesófilos. A autora relata que a presença de bactérias mesófilas é normal no leite humano e que esta presença diminuiria a qualidade do leite.

Para a oferta do leite cru da própria mãe, é necessário o emprego de uma norma rígida. A mãe deve ser muito bem orientada com relação a suas práticas de higiene pessoal, e lavagem rigorosa das mãos antes da coleta do leite no domicílio. Ela deve ser orientada com relação ao correto armazenamento e transporte até o ambiente hospitalar, e, uma vez neste, a equipe do lactário deve seguir rigorosamente as normas sanitárias para evitar a contaminação do leite <sup>47</sup>.

A presença de bactérias no leite provoca a fermentação do mesmo elevando a sua acidez. Entretanto, esta acidez elevada nem sempre é indicativa de contaminação. Scarso<sup>48</sup> analisou amostras de leite com acidez elevada e com acidez normal com relação à presença de microrganismos e encontrou em seu estudo amostras com acidez elevada, mas sem microrganismos e amostras com acidez normal com microrganismos. Assim, afirma que a própria produção do leite pode estar relacionada à acidez elevada e conclui que a utilização da titulação Dornic para avaliar a qualidade do leite, por avaliar indiretamente o crescimento bacteriano, não é um método eficaz.

Normalmente o leite descartado nos BLH tem correlação com a contaminação que ocorre durante a coleta, estocagem e armazenamento domiciliar, como também com o transporte até chegar aos hospitais. Isso faz com que o leite fique impróprio para o consumo<sup>49</sup>.

Souza e Silva<sup>31</sup> também afirmam que o leite pode sofrer processo de contaminação durante a sua manipulação, pela contaminação e baixa higienização do recipiente de armazenamento e do próprio ambiente.

As bactérias presentes no leite materno se originam na pele da mama, nos ductos lactíferos e no mamilo e são transferidas via amamentação para o lactente<sup>50</sup>. Castro<sup>46</sup> afirma que é possível encontrar no leite, provenientes da pele da aréola e da mama, bactérias como: *Enterobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia* e *Streptococcus viridians*.

Oliveira et al.<sup>51</sup> afirmam que, para evitar um processo de infecção patogênica, uma higiene correta da mama deve ser realizada. Entretanto, não indicam em seu estudo que tipo de higiene ou de produto devem ser utilizados.

Mense et al.<sup>52</sup> analisaram a presença de microrganismo no leite de mães que tiveram seus filhos abaixo de 32 semanas de idade gestacional, que ordenharam seu leite no hospital ou no ambiente doméstico e mantinham este leite a 4°C. Foram orientadas a lavar a mama com água limpa e deixar secar espontaneamente. Compararam a presença de microrganismos entre o seio Direito (primeiro a ser ordenhado) e o Esquerdo (segundo a ser ordenhado) e encontraram diferença estatisticamente significativa de quantidade de bactérias entre as mamas. Concluíram que isto pode ter ocorrido pelo intervalo de tempo de limpeza entre um seio e outro. As bactérias encontradas foram: *Alfa hemolytic*, *Streptococcus*, *S. Aureus*, gram negativa como *Escherichia coli* e *Klebsiela pneumoniae* e *Enterococcus*.

Grazziotin<sup>53</sup> afirma que alguns hospitais não utilizam o leite da própria mãe, e quando o fazem, determinam um horário para que a mesma retire o leite dentro da própria unidade ou um horário para que amamente seu filho ao lado da incubadora, não estimulando a prática da produção do leite materno. Uma das razões para que isto ocorra é a falta de informação sobre a ausência da oferta do risco deste leite.

Por que a oferta de leite cru é importante ao RNPT? A oferta de leite da própria mãe promoveu um ganho de peso maior dessas crianças do que o das que receberam leite pasteurizado de doadoras de leite e este fato não aumentou a incidência de processo infeccioso e de enterocolite necrosante<sup>36</sup>.

O leite de mulheres sadias também abriga bactérias como *lactobacilos*; *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*, sendo o *S. epidermidis* o mais encontrado no leite, chegando a 10<sup>3</sup> UFC/mL. O *Enterococcus* e os *lactobacilos* estão presentes no leite humano, seja qual for o estado de saúde da mãe, seu país de origem ou seu estado social, indicando que esses microrganismos fazem parte da microbiologia natural do leite humano e variam de mulher para mulher. As bactérias encontradas no intestino do recém-nascido refletem aquelas encontradas no leite humano, sendo este responsável pelo desenvolvimento da microbiota do intestino<sup>54</sup>.

Estudos recentes afirmam que a oferta de leite humano para crianças abaixo de 1.500g determina benefícios e diminui a incidência de enterocolite necrosante<sup>34, 55</sup>.

O aleitamento materno melhora o processo digestivo, promove o crescimento e o desenvolvimento neurológico, emocional e cognitivo, melhora o desenvolvimento do sistema imunológico e favorece o vínculo<sup>56</sup>. O leite materno contém probióticos que auxiliam no desenvolvimento da flora do intestino<sup>57</sup>.

Ao nascimento, o pâncreas e o trato gastrintestinal ainda são imaturos e o amadurecimento vai ocorrer no primeiro ano de vida, sendo o aleitamento materno responsável por conferir proteção imunológica à criança nesse período<sup>58</sup>.

Grazziotin<sup>53</sup> também afirma que, quando o RNPT recebe leite materno de sua genitora, tem crescimento maior do que o de crianças que receberam leite proveniente do BLH. Afirma que a oferta de leite doado, entretanto, é melhor do que o uso de fórmulas.

Anderson et al.<sup>59</sup> compararam o ganho de peso de recém-nascidos que receberam o leite de suas próprias mães pasteurizado e sem pasteurização e concluíram que as crianças que receberam o leite de suas mães, sem o processo de pasteurização, ganharam mais peso e estatura.

A oferta do leite cru traz inúmeros benefícios, como a maturação gastrintestinal e cerebral<sup>60</sup>. Grazziotin<sup>53</sup> afirma em seu estudo que vários trabalhos sobre nutrição apontam que o leite humano é importante para o desenvolvimento e qualidade de vida para o RNPT. Entretanto, Cossey et al<sup>61</sup> afirmam que o uso deste leite requer práticas rigorosas de higiene e controle.

Segundo Mense et al.<sup>52</sup> a oferta de leite materno reduz a infecção, enterocolite necrosante e sepse neonatal. Os lactobacilos e o fator bífidos presentes no leite auxiliam no desenvolvimento da flora bacteriana do intestino e protegem de muitas maneiras as crianças. Os mesmos autores relatam que, em seu hospital, o leite materno cru é oferecido para os recém-nascidos somente após ser testado com relação à presença de bactérias.

Schanler et al.<sup>62</sup> afirmam que cada vez mais está sendo ofertado o leite da própria mãe para o RNPT devido aos benefícios que esta prática traz para

essas crianças. Entretanto, em seu hospital, a liberação desse leite só acontece após a análise bacteriana.

Os parâmetros nutricionais para o RNPT são difíceis de serem alcançados, como já relatado neste estudo. Isto se dá pela condição clínica da criança, em geral grave, como também pela limitada tolerância digestiva e metabólica<sup>53</sup>. Entretanto, crianças que receberam leite materno têm menos incidência de infecção do que as que recebem fórmula, isto devido a sua melhor digestibilidade e sua composição química balanceada<sup>53</sup>.

Grazziotin<sup>53</sup> afirma em seu estudo que, quando a mãe é bem orientada, a transmissão de microrganismos ao leite, que podem produzir ácido láctico elevando o grau de acidez Dornic, é baixo. Isso aumentaria a qualidade do leite cru ofertado ao RNPT oriundo de sua própria mãe. O manejo deste leite deve ser o mais rigoroso possível para evitar a contaminação do mesmo, uma vez que essas crianças são extremamente frágeis devido à imunidade imatura.

Rodrigues et al.<sup>54</sup> afirmam que a oferta de colostro da própria mãe, que tem fatores de proteção elevados, pode ser uma alternativa para recém-nascidos pré-termo extremo, sendo uma possibilidade segura, de baixo custo, disponível e não provoca efeitos adversos nos RN que o receberam.

Reisinger et al.<sup>63</sup> também observaram que a maturação do intestino foi maior nos recém-nascidos que receberam leite materno do que os que receberam fórmula.

Stam et al.<sup>29</sup> relatam em seu estudo, que realizaram uma análise de literatura, que o leite humano traz inúmeros benefícios, sendo a nutrição ideal para as crianças a termo, afirmando entretanto que o mecanismo exato dos benefícios não está claro.

Pode-se perceber, portanto, que, apesar da possibilidade da contaminação do leite materno cru, a sua oferta tem trazido benefícios ao recém-nascido pré-termo.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ideia inicial deste estudo foi o de comparar e determinar a quantidade de minerais e eletrólitos (cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio) do leite humano, no sentido de solidificar que o leite de beira de leite da mãe do RNPT é um alimento adequado a ser ofertado ao mesmo, podendo trazer inúmeros benefícios. Apesar da concentração do cálcio, do fósforo e do potássio serem inferiores à do leite cru de mãe de RNT, a dosagem do magnésio, sódio e potássio do leite de beira de leite supera o recomendado pelo ESPGHAN <sup>26</sup>. Entretanto, a dosagem do cálcio e do fósforo não atendem ao recomendado, sendo necessária, portanto, a suplementação do leite materno com esses elementos.

A concentração de sódio e de potássio do leite cru, de beira de leite, superou a quantidade destas substâncias no leite submetido ao processo de pasteurização, sendo o sódio maior também que o do leite maduro cru de mães de recém-nascidos a termo doadoras de leite.

Pôde-se verificar no decorrer deste estudo que houve uma redução significativa da concentração de nutrientes após as amostras de leite terem sido submetidas ao processo de estocagem, congelamento e pasteurização. Entretanto, este leite ainda traz mais benefícios ao RNPT do que os nutrientes e substâncias ofertados por meio de fórmulas artificiais. Este leite promove uma maturação maior do intestino, prevenindo a enterocolite e processos infecciosos. Mas se a opção de ofertar o leite cru de sua própria mãe for possível, os benefícios podem ser maiores e essa oportunidade deve ser incentivada pela equipe multidisciplinar.

É necessária, entretanto a análise da presença de microrganismos no leite ou a instituição de práticas que previnam a contaminação do leite. Os resultados do BGBL mostraram que metade das amostras analisadas foram positivas para coliformes totais. Entretanto, não se pode afirmar, por falta de dados, se outras bactérias poderiam ter sido detectadas, alterando assim o resultado final do teste. Não ocorreu a avaliação de que tipo de microrganismo

estava presente nos testes com BGBL positivo por uma limitação funcional do laboratório que fez estas análises.

Para evitar uma suposta contaminação do leite, é necessário que as mães sejam muito bem orientadas e acompanhadas com relação à higienização correta das mãos com água e sabão, após a sua paramentação com gorro e máscara descartáveis, e da higienização da mama com água limpa, esperando a mesma secar, como sugerido em estudo abordado neste trabalho, com o intuito de diminuir a contaminação do leite a ser coletado e depois ofertado ao recém-nascido. As orientações devem ser fornecidas pessoalmente, e os funcionários responsáveis devem acompanhar as mães durante a primeira coleta, verificando se as mesmas entenderam e executam as orientações fornecidas. É importante também realizar orientações por escrito para que elas possam esclarecer dúvidas que possam surgir no domicílio.

O leite cru deve ser inspecionado como recomendando pelas normas da Rede Brasileira de BLH, com avaliação da acidez Dornic ou do BGBL, para evitar que um leite contaminado seja ofertado ao RNPT, que tem estrutura frágil e baixa imunidade corporal. Mas, como visto aqui, a acidez nem sempre é confiável para determinar a existência de microrganismos ou não, como também o BGBL pode ser positivo com relação à presença de outros microrganismos. Há que se considerar que novos métodos ou uma melhora nos métodos já existentes precisam ser desenvolvidos, como também normas específicas para o manejo do leite materno cru.

A oferta do leite cru da própria mãe, respeitando os preceitos da cadeia de frio e de não contaminação das amostras, poderia aumentar a possibilidade de oferta de leite humano nos hospitais com poucos recursos ou naqueles que ainda não possuem um banco de leite humano, trazendo inúmeros benefícios aos recém-nascidos, principalmente para os pré-termo.

Na direção dessa proposta, recentemente a Rede Global de Banco de Leite Humano fez uma publicação, voltada aos profissionais de saúde, para garantir a manipulação e uso do leite humano ordenhado cru no ambiente hospitalar neonatal visando a segurança do paciente. O documento contém orientações com relação a obtenção higiênico-sanitária do LHO, tendo como foco principal, os possíveis riscos inerentes a sua ordenha, estocagem,

conservação, transporte, porcionamento e administração no ambiente hospitalar. É mais uma medida para aumentar os índices de aleitamento materno em todas as unidades neonatais<sup>64</sup>.

Em resumo, e tentando responder aos questionamentos que determinaram a realização dessa pesquisa quanto a existir diferença entre a composição do leite humano cru e a do leite humano pasteurizado, verifica-se que existe uma redução na concentração dos eletrólitos e minerais na comparação do leite antes e depois da pasteurização. Também existe uma diferença estatisticamente significativa na comparação do leite cru com o pasteurizado e antes de pasteurizar.

Do estudo também concluímos ser necessária a complementação do leite humano com relação à concentração de cálcio e fósforo.

Outro questionamento foi se a administração de leite humano cru ordenhado em domicílio, antes de uma avaliação com relação à presença de microrganismos, traz riscos ao pré-termo. Como visto no estudo atual existe uma positividade na avaliação do BGBL do leite colhido em beira de leito. A oferta do leite proveniente de ambiente doméstico, no qual a equipe não acompanha o processo de ordenha e armazenamento, como também do transporte deste, pode trazer riscos ao prematuro.

Quanto ao risco do recém-nascido receber o leite extraído na beira do leito em relação ao leite pasteurizado, temos que o leite cru apresenta positividade quanto à avaliação do BGBL. Entretanto, por limitações do laboratório de análises químicas e biológicas não foi possível verificar se esta contaminação era por coliformes ou outro microrganismo. Muitos estudos, como apontado na discussão, demonstram que a oferta deste leite não trouxe aumento do risco de infecção hospitalar. Considerando-se que a oferta do leite pasteurizado reduz os componentes do leite, a oferta do leite cru colhido em ambiente hospitalar parece ser uma boa proposta de nutrição do recém-nascido, principalmente em locais onde não haja banco de leite humano. Além disso, a oferta de leite cru, colhido em beira de leito, pode trazer inúmeros benefícios ao RBPT, com um controle de qualidade de baixo custo que pode ser seguido pelos hospitais que não fazem parte da Rede de BLH. Para os que fazem parte, este leite deve ser avaliado e de acordo com o resultado realizar o processo de pasteurização do mesmo.

Como pode ser observado o presente estudo não se esgota aqui. É necessário uma análise mais profunda com relação a positividade do BGBL com a identificação do microrganismo que está acarretando esta positividade, como também analisar o efeito da assepsia da mama e os produtos a serem utilizados na avaliação desta positividade.

## 8. CONCLUSÃO

- 1- Na comparação da concentração dos eletrólitos e minerais do leite, pode-se verificar que ocorreu uma redução significativa destes na comparação das amostras após a pasteurização. A concentração no leite de mães de RNPT colhido na beira de leite é inferior para o cálcio e fósforo, mas é superior na concentração de sódio.
- 2- A concentração obtida neste estudo para o cálcio e fósforo indica a necessidade de complementação do leite com fortificantes para estes elementos.
- 3- Para o resultado do BGBL, verificou-se que o processo de pasteurização é efetivo, e que as amostras colhidas antes de pasteurizar e á beira de leite apresentaram um alto índice de positividade.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Scochi CG. A humanização da assistência hospitalar ao bebê prematuro, bases teóricas para o cuidado de enfermagem [tese livre docência]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2000.
2. Margotto, PR. Recém-nascido pré-termo extremo: limite de viabilidade. 2001. Acesso em: 13 out 2017. Disponível em: <[www.paulomargotto.com.br/documentos/LIMVIA.doc](http://www.paulomargotto.com.br/documentos/LIMVIA.doc)>.
3. Rolim KM, Cardoso MV. O discurso e a prática do cuidado ao recém-nascido de risco: refletindo sobre a atenção humanizada. Rev Lat Am Enfermagem. 2006;14(1): 85-92.
4. Belik J. In time: enteral nutrition for preterm infants: so much learned, but we will still don't know how to best feed them. Rev Paul Pediatr. 2017; 35(3): 242-3.
5. Trindade CE. Importância dos minerais na alimentação do pré-termo extremo. J Pediatr (Rio J). 2005; 81 Suppl 1:S43-51.
6. Coperleijn WE, van den Vermeulen MJ, van Akker CH, Goudoever JB. Feeding very-low-birth-weight infants: our aspirations versus the reality in practice. Ann Nutr Metab. 2011; 58 Suppl 1:20-9.
7. Ziegler EE. Meeting the nutritional needs of the low-birth-weight infant. Ann Nutr Metab. 2011; 58 Suppl 1:8-18.
8. Cooke R. Nutrition of Preterm Infants after discharge. An Nutr Metab. 2011; 58 Suppl1: 32-6.
9. Harding JE, Cormack BE, Alexander T, Alsweiler JM, Bloomfield FH. Advances in nutrition of the newborn infant. Lancet. 2017 Apr 22; 389 (10079): 1660-8.

10. Thomaz DM, Serafim PO, Palhares DB, Melnikov P, Venhofen L, Vargas MO. Comparação entre suplementos homólogos do leite humano e um suplemento comercial para recém-nascidos de muito baixo peso. *J Pediatr (Rio J)*. 2012; 88(2):119-24.
11. Braga LP, Palhares DB. Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. *J Pediatr (Rio J)*. 2007; 83(1):59-63.
12. Tudehope DI. Human milk and the nutritional needs of preterm infants. *J Pediatr*. 2013; 162 Suppl 3: S17-25.
13. Pessoto MA. Avaliação da lactação em mães de recém-nascido pré-termo com peso de nascimento inferior a 1.250 gramas segundo diferentes métodos de ordenha, manual, com bomba manual ou com bomba elétrica [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2009.
14. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013; 60(1):49-74.
15. Bocca B, Alimonti A, Coni E, Pasquale MP, Giglio L, Bocca AP, *et al*. Determination of the total content and binding pattern of elements in human milk by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*. 2010; 53(2000):295-303.
16. Fogleman AD. Calcium and phosphorus supplementation in human donor milk for premature infants [thesis]. North Carolina State University; 2011.
17. American Academy of Pediatrics. Organizational Principles to Guide and Define the Child Health Care System and/or Improve the Health of all Children. Section of Breastfeeding. Breastfeeding and the use of Human Milk. *Pediatrics*. 2005; 115(2): 496-506.

18. Serafini AB; André MCDPB; Rodrigues MAV; Kipnis A; Carvalho CO; Campos MRH, *et al.* Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite/ Microbiological quality of human milk from a Brazilian milk bank. *Rev Saude Publica.* 2003 dez; 37(6):775-9.
19. Morgano MA, Souza LA, Neto JM, Rondó PH. Composição mineral do leite materno de bancos de leite. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2005; 25:819-24.
20. St-Remy RR, Sanchez ML, Sastre JB, Sanz-medel A. Multielemental distribution patterns in premature human milk whey and pre-term formula milk whey by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octopole reaction cell. *J Anal At Spectrom.* 2004; 19:1104-10.
21. Perales S, Barberá R, Lagarda MJ, Farréa R. Bioavailability of calcium from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialyzability, and up take and transport by caco-2 cells. *J. Agric Food Chem.* 2005; 53(9):3721-6.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos [Internet]. Brasília; ANVISA; 2008. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br/media/blhanv2008.pdf>. Acesso em 14/10/2017.
23. Nascimento EF, Padilha MRF. Estudo comparativo entre a prova da fosfatase alcalina e a análise microbiológica de leite humano processado em banco de leite do Recife-PE. *RBCA.* 2010; 42(2): 97-100.
24. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Epidemiologia Clínica: Elementos Essenciais.* 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 2006.
25. Hulley SB, Cummings SR, Browner WR, Grady D, Hearst N, Newman TB. *Delineando a Pesquisa Clínica.* 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Artmed SA; 2008.

26. Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, Curtis M, Darmaun D, Decsi T, *et al.* Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010; 50(1):85-91.
27. Emmett PM, Rogers IS. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early Hum Dev.* 1997; 49 Suppl: S7-28.
28. Picciano MF. Nutrient composition of human milk. *Pediatr Clin North Am.* 2001;48(1):53-67.
29. Stam J, Saver PJ, Pieter JJ, Boehm G. Can we define an infant's need from the composition of human milk? *Am J Clin Nutr.* 2013; 98(2): 521S-8S.
30. Bates CJ, Prentice A. Breast milk as a source of minerals. *Pharmacol Ther.* 1994; 62(1-2):193-220.
31. Souza PP, Silva JA. Monitoramento da qualidade do leite humano ordenhado e distribuído em banco de leite de referência. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2010; 69(1):7-14.
32. Bortolozo EA, Tiboni EB, Cândido LM. Leite humano processado em bancos de leite para o recém-nascido de baixo-peso: análise nutricional e proposta de um novo complemento. *Rev Panam Salud Publica.* 2004; 16(3):199-205.
33. Underwood MA. Human milk for the premature infant. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60(1):189-207.
34. American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition; Section on Breastfeeding; Committee on Fetus and Newborn. Donor human milk for the high-risk infant: preparation, safety, and usage options in the United States. *Pediatrics.* 2017; 139(1)pie 20163440.

35. Catache M, Leone CR. Análise crítica dos aspectos fisiopatológicos, diagnósticos e terapêuticos da doença metabólica óssea em recém-nascidos de muito baixo peso. *J Pediatr (Rio J)*. 2001; 77 (Supl. 1): S53-62.
36. Montjaux-Regis N, Cristini C, Arnaud C, Gloreux I, Vanpee M, Casper C. Improved growth of preterm infants receiving mothers own raw milk compared with pasteurized donor milk. *Acta Pediatr*. 2011; 100(2): 1548-54.
37. Borges MS. Avaliação da qualidade do leite humano ordenhado [Dissertação]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; 2016.
38. Araújo LPP, Silva MG, Santos DS, Bessa ME, Rodarte MP, Furtado AM , *et al*. Análise de coliformes em leite humano ordenhado. *Interagir: pensando a extensão*. (Rio J). 2010; 15: 29-34.
39. Novak FR, Junqueira AR, Dias M de S, Almeida JAG. Análise sensorial do leite humano ordenhado e sua carga microbiana. *J Pediatr (Rio J)*. 2008; 84(2): 181-4.
40. Neto Assis AC, Pereira MMG, Pereira TG, Santos MCM. Perfil microbiológico do leite materno do banco da maternidade Evangelina Rosa-Teresina (Piauí). *B CEPPA, Curitiba*. 2001; 19(1): 75-84.
41. Silva ER da; Abdallah VOS; Oliveira AM de M. Qualidade microbiológica do leite humano ordenhado no domicílio: eficácia de uma ação educativa. [Internet]. Universidade federal de Uberlândia. 4ª Semana do Servidor e 5ª Semana Acadêmica. 2008. Disponível em: <https://ssl4799.websiteseguro.com/swge5/seg/cd2008/PDF/SA08-21093.PDF>. Acesso em 14/10/2017.

42. Moulin ZS, Lamounier JA, Vieira MBCM, Baêta M, Silva MAD, Araújo RSS. Contaminação bacteriana do leite humano coletado por expressão manual e estocado à temperatura ambiente. *J Pediatr (Rio J)*. 1998; 74(5): 376-82.
43. Nobre GC; Coelho RC; Silva NM da; Diniz YB; Guerra, RC. Análise microbiológica do leite humano cru do banco de leite de um hospital de Araguaína-TO [Internet]. *Revista Científica do IIPAC*. 2015; 8(2). Dispon[ível em: [https://www.itpac.br/arquivos/Revista/75/Artigo\\_8.pdf](https://www.itpac.br/arquivos/Revista/75/Artigo_8.pdf). Acesso em 14/10/2017.
44. Novak FR, Almeida JAG, Asensi MD, Moraes BA, dos Prazeres Rodrigues D. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. *Cad Saude Pública (Rio J)*. 2001; 17(3): 713-7.
45. Silveira LAM, D'Amorim MFG, Silva VRD, Terra APS. Controle microbiológico do leite humano de um hospital universitário [Internet]. *Revista Baiana de Saúde Pública*. 2012; 36(3):844-50. Disponível em: <http://rbsp.sesab.ba.gov.br/index.php/rbsp/article/view/560/336>. Acesso em 14/10/2017.
46. Castro MRCC. Avaliação da qualidade microbiológica de leite humano cru recebido em banco de leite humano [Dissertação] [Internet]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-Universidade de São Paulo; 2006. Disponível em: [file:///C:/Users/Sony%20Vaio/Downloads/MariaCastro%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Sony%20Vaio/Downloads/MariaCastro%20(1).pdf). Acesso em 14/10/2017.
47. Novak R, Almeida JAG, Santos MJS, Wanke B. Contaminação do leite humano ordenhado por fungos miceliais. *J Pediatr (Rio J)*. 2002; 78(3): 197-201.
48. Scarso IS. Estudo dos fatores que condicionam acidez elevada em leite humano: aspectos microbiológicos e nutricionais [Dissertação] [Internet]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- universidade de

São Paulo; 2008. Disponível em:  
file:///C:/Users/Sony%20Vaio/Downloads/isis.pdf. Acesso em 14/10/2017.

49. Grazziotin AL, Grazziotin MCB, Letti, LAJ. Descarte de leite humano doado ao banco de leite antes e após medidas para reduzir a quantidade de leite impróprio para consumo. *J Pediatr (Rio J)*. 2014; 86(4):290-4.

50. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 1999; 69(5): 1035S-45S.

51. Oliveira GS, Luchese RH, Novak FR, Abreu DPB, Martins MD. Contaminação fúngica no leite humano em sítios anatômicos de lactantes e lactentes. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012; 71(3): 450-5.

52. Mense L, Rößler S, Hanusch R, Roßberg C, Rüdiger M. Bacterial Contamination of mechanically extracted breastmilk. *Am J Perinatol*. 2013; 31(4): 293-8.

53. Grazziotin MB. Efeito dos diferentes modos e tempos de estocagem sobre a acidez e o valor calórico do leite humano ordenhado cru de mães com recém-nascidos internados em uma unidade de neonatologia [Dissertação] [Internet]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2014.

54. Rodriguez NA, Meier PP, Groer MW, Zeller JM, Engstrom JL, Fogg L. A pilot Study to determine the safety and feasibility of oropharyngeal administration of own mother's colostrum to extremely low birth weight infants. *Adv Neonatal Care*. 2010; 10(4): 206-12.

55. Jeffrey BS, Soma-Pillary P, Makin J, Moolman G. The effect of pretoria pasteurization on Bacterial Contamination of hand-expressed human breastmilk. *J Tropical Pediatr*. 2003; 49(4): 240-4.

56. Cavalcanti JLP, Telles FJS, Peixoto MMLV, Rodrigues RCB. Uso da acidez titulável no controle da qualidade do leite humano ordenhado. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2005; 25(1): 103-8.
57. Karimi M; Eslami Z; shamsi F; Moradi J; Ah-Madi AY; Baghianimoghadam B. The effect of educational intervention on decreasing mother's expressed breast milk bacterial contamination whose infants are admitted to neonatal intensive care unit. *J Res Health Sci.* 2013; 13(1): 43-7.
58. Huerou-Luron IL, Blat S, Boudry G. Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nut Res Rev.* 2010; 23(1):23-36.
59. Anderson Y, Sävman K, Bläckberg L, Hernell O. Pasteurization of mothers own milk reduces fat absorption and growth in preterm infants. *Acta Paediatr.* 2007; 96(10): 1445-9.
60. Freitas BCC, Lima LM, Carlos CFLV, Priore SE, Franceschini S do C. Duração do aleitamento materno em prematuros acompanhados em serviço de referência secundário. *Rev Paul Pediatr.* 2016; 34(2): 189-96.
61. Cossey V, Jeurissen A, Thelissen MJ, Vanhole C, Schuermans A. Expressed breast milk on a neonatal unit: a hazard analysis and critical control points approach. *Am J Infect Control.* 2011; 39(10):832-8.
62. Schanler RJ, Fraley JK, Lau C, Hurst NM, Horvath L, Rossmann SN. Breastmilk cultures and infection in extremely premature infants. *J Perinatol.* 2011; 31(5):335-8.
63. Reisinger KW, de Vaan, Kramer BW, Wolfs T, van Heurn LW, Derik JP. Breastfeeding improves gut maturation compared with formula feeding in preterm babies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 59(6): 720-4.

64. Rede Global de Bancos de Leite Humano (Brasil). Procedimentos técnicos para ordenha, manipulação e administração do leite humano cru exclusivo da mãe para o próprio filho em ambiente neonatal. [2017]. Disponível em:<[https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/8/nt\\_procedimentos\\_ordenha\\_manipulacao\\_leite\\_cru.pdf](https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/8/nt_procedimentos_ordenha_manipulacao_leite_cru.pdf)>. Acesso em: 7 set. 2017.

## APÊNDICE

### APÊNCIDE 01: ARTIGO 01

Já aprovado para publicação Revista Paulista De Pediatria

**Composição eletrolítica e mineral do leite de lactantes a termo pré- e pós-pasteurização e de leite cru de mães de recém-nascido pré-termo.**

**Elementos químicos do leite humano: antes e após pasteurização e beira de leito.**

*Composition of electrolytes and minerals from term donor human milk before and after pasteurization and from raw milk preterm mothers collected at bedside*

**Chemical elements of human milk: before and after pasteurization, and at bedside.**

Carla Regina Bianchi Codo. Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Endereço: Rua Armando Walter Radeschi, 48, Vila Solar. Limeira-SP. CEP: 13480-492  
[carlacodo@yahoo.com.br](mailto:carlacodo@yahoo.com.br)

**Jamil Pedro de Siqueira Caldas:** Doutor. Professor Doutor I do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas, SP, Brasil.

Rafaella Regina Alves Peixoto. Doutora em Ciências do Grupo de Espectrometria Atômica (GEAtom) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Endereço: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP: 6154, CEP: 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

Vitor Lacerda Sanches. Mestrando em Química do Grupo do Grupo de Espectrometria Atômica (GEAtom) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Endereço: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP: 6154, CEP: 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

Tamara Cristina Guiraldelo. Graduanda em Química do Grupo de Espectrometria Atômica (GEAtom) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Endereço: Instituto de Química,

Universidade Estadual de Campinas, CP: 6154, CEP: 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

Solange Cadore. Professora livre-docente, Doutora em Ciências do Grupo de Espectrometria Atômica (GEAtom) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Endereço: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP: 6154, CEP: 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

Sérgio Tadeu Martins Marba. Professor Titular do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Endereço: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti. Rua Alexander Fleming, 101. Barão Geraldo, Campinas. CEP: 13083-881

Este estudo não recebeu financiamento.

Não há conflito de interesses.

Total de palavras: 2.866.

## Resumo

**Objetivo:** Determinar e comparar as concentrações de eletrólitos e minerais no leite humano em três grupos: amostras analisadas antes e após pasteurização de lactantes doadoras a termo e amostra de leite cru colhida à beira do leite de mães de recém-nascidos pré-termo. **Métodos:** Estudo descritivo de corte transversal. Foram dosadas concentrações de cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), sódio (Na) e potássio (K) em amostras aleatórias de leite humano nos três grupos. As amostras foram analisadas por mineralização ácida assistida por radiação micro-ondas e posteriormente por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e expressas em mg/L, com cálculo de médias e desvio padrão. A comparação entre os grupos foi feita por análise de variância (ANOVA)/teste de Tukey. Nível de significância aceito de 5%. **Resultados:** Observou-se uma redução significativa dos teores de Ca ( $259,4 \pm 96,8$  x  $217,0 \pm 54,9$ ;  $p=0,003$ ), P ( $139,1 \pm 51,7$  x  $116,8 \pm 33,3$ ;  $p=0,004$ ) e K ( $580,8 \pm 177,1,4$  x  $470,9 \pm 109,4$ ;  $p<0,0001$ ) após a pasteurização. As amostras de leite cru colhidas à beira do leite apresentaram teores estatisticamente mais elevados de Na – 2 vezes - que o leite a termo de doadora. Ca e P só atingem a ingestão recomendada pela European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition se o leite materno for ofertado em volume de 60 mL a cada 3 horas. Concentrações de magnésio não diferiram entre os grupos. **Conclusões:** houve uma redução significativa de Ca, P e K nas amostras após pasteurização e os valores de Na no leite cru coletado à beira do leite foram superiores àqueles pré-pasteurização.

*Palavras-chave:* nutrição da criança, aleitamento materno, leite humano, nutrientes.

## Abstract

**Objective:** To determine and compare the concentrations of electrolytes and minerals in three different types of maternal milk samples: term donor milk before pasteurization, term donor milk after pasteurization and bedside pre-term mothers raw milk. **Methods:** Descriptive cross-sectional study. Concentrations of calcium (Ca), phosphorous (P), magnesium (Mg), sodium (Na) and potassium (K) were measured in aleatory samples of three human breast milk groups. Samples were analyzed using acid mineralization assisted by microwave radiation and further analysis by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. Concentrations were expressed in mg/L described as mean and standard deviation. The one-way ANOVA and Tukey's post-test was applied to determine the variability between the means of each group. The level of significance was set at 5%. **Results:** There were a significant reduction in the content of Ca ( $259.4 \pm 96.8$  x  $217.0 \pm 54.9$ ;  $p=0.003$ ), P ( $139.1 \pm 51.7$  x  $116.8 \pm 33.3$ ;  $p=0.004$ ) and K ( $580.8 \pm 177.1$  x  $470.9 \pm 109.4$ ;  $p<0.0001$ ) in donor maternal milk before and after pasteurization. Samples of raw milk presented higher contents of Na than the donated milk (2X). The elements P and Ca only reached the daily intake levels recommended by the European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition if the milk is offered in a volume of 60 mL every 3 hours, at least. Magnesium levels weren't different among three groups. **Conclusions:** There was a significant reduction in Ca, P and K levels in AP samples. Na values were higher in raw milk of preterm mothers' samples than in prior pasteurization donors' milk.

*Keywords:* child nutrition, breast feeding, human milk, nutrients.

**Fonte de financiamento:** Este estudo não recebeu financiamento.

**Declaração de conflito de interesse:** Não há conflito de interesses.

**Número total de palavras no resumo:** 250

**Número total de palavras no abstract:** 244

**Número total de palavras no texto:** 2.939

**Número total de tabelas:** 4

**Número de referências:** 29

## Introdução

Nas últimas décadas tem sido observado um aumento na sobrevivência de recém-nascidos pré-termo (RNPT). Este fato origina-se da melhor qualidade da assistência pré-natal e no desenvolvimento da expertise dos profissionais da área neonatal, aliado ao desenvolvimento de novas técnicas de cuidado do recém-nascido<sup>1-2</sup>

A alimentação enteral dos RNPT é um desafio, pois não se sabe ao certo o que é necessário para oferecer uma nutrição que supra todas as necessidades de crescimento e desenvolvimento. Tais necessidades nutricionais são muito variadas e mudam de acordo com a idade gestacional, peso de nascimento e doenças de base,<sup>3-5</sup> exigindo da equipe um acompanhamento constante de crescimento e das repercussões da dieta no metabolismo do paciente pré-termo. Muitos avanços foram obtidos nesta área, mas ainda existem várias questões não respondidas e controversas, como a quantidade e a qualidade de proteínas e energia a serem ofertados ao pré-termo, além da composição nutricional ideal, que permita um crescimento semelhante ao do ambiente intrauterino.<sup>3,6-10</sup>

A oferta de uma alimentação adequada, da qual faz parte o leite humano, possibilita maior sobrevivência do RNPT, como também, a médio e longo prazo, o seu crescimento e desenvolvimento.<sup>11</sup> Quanto mais precoce a oferta de leite humano, mesmo em idades gestacionais menores, maior a probabilidade de proteção contra processos infecciosos, redução da incidência de enterocolite necrosante e colonização do intestino com fator bífido e lactobacilos, com aumento da tolerância alimentar.<sup>8-10,12</sup> Em geral, crianças que foram pré-termo têm déficit de crescimento, sendo que 50% deste déficit está

relacionado à alimentação o que pode se iniciar já nas primeiras semanas de vida e afetar principalmente o desenvolvimento cerebral.<sup>7-10</sup>

O leite humano supre as necessidades dos RNPT nas primeiras semanas de vida em relação a fatores de proteção e crescimento tais como conteúdo proteico, enzimático, valor energético e imunológicos.<sup>11</sup> Após este período, a oferta de nutrientes diminui, principalmente em relação à quantidade de fósforo, proteína e cálcio, sendo necessária a suplementação do leite com o acréscimo de nutrientes industrializados.<sup>13,14</sup>

Além disso, quando se utiliza leite humano de doadora, há relato de que processo de pasteurização e evaporação do leite materno pode levar à redução do conteúdo de cálcio e fósforo, abaixo dos valores recomendados pelos comitês de nutrição da Sociedade Europeia de Pediatria e Gastroenterologia e da Sociedade Canadense de Pediatria.<sup>7</sup>

Deste modo, é importante conhecer as diferenças existentes nas concentrações de determinados eletrólitos e minerais no leite materno, quando analisado em estado fresco ou após processo de pasteurização, com o propósito de adequar a oferta nutricional, especialmente aos RNPT.

Assim, o objetivo do presente estudo foi o de determinar e comparar a composição de eletrólitos e minerais no leite humano de acordo com o tipo de lactante (doadora a termo ou mãe de pré-termo) e do leite (congelado ou cru) a ser oferecido à criança.

## Método

Foi realizado um estudo descritivo de corte transversal. Os eletrólitos e minerais dosados no leite humano foram fósforo, cálcio, sódio, potássio e magnésio.

As lactantes incluídas no estudo foram mães de recém-nascidos a termo, doadoras do banco de leite humano, das quais se obteve as amostras antes e após a pasteurização e mães de RNPT das quais foram obtidas amostras de leite cru à beira do leito.

Para o cálculo do tamanho amostral, utilizou-se o estudo desenvolvido por Morgano *et al*<sup>15</sup> que determinou as dosagens de eletrólitos em leite humano em comparação com os aceitáveis pela literatura. Para o tamanho amostral foi estabelecido que as diferenças das médias não deveriam ultrapassar 1% do obtido no estudo e assim cada grupo deveria ter no mínimo 17 amostras, para propiciar um poder de teste de 80%.<sup>16,17</sup>

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com CAAE 35545314.4.0000.5404; aprovação REBEC RBR-7994vz e obteve-se a concordância das mães para obtenção das amostras de leite com a assinatura do TCLE.

Para a coleta de todas as amostras de leite foi respeitada as normas estabelecidas para os bancos de leite no Brasil, ou seja, paramentação da mãe com gorro e máscara e, quando necessário, da pesquisadora com gorro, máscara e luva de procedimento.<sup>18</sup>

As amostras de leite de mães de RNPT foram obtidas em diferentes períodos do dia, sendo algumas coletadas após a amamentação dos RNPT internados na unidade neonatal. Outras amostras foram obtidas sem que

houvesse ocorrido a amamentação, devido às condições clínicas do recém-nascido.

As amostras das mães doadoras, que tiveram seus filhos a termo, foram obtidas do banco de leite humano da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Limeira, de forma aleatória e provenientes de vários momentos e dias de coleta realizada em ambiente doméstico. As mães receberam orientações dos profissionais locais onde foram executados testes pré-estabelecidos que viabilizam este tipo de doação. A equipe desse hospital foi responsável por passar nas residências das doadoras para a recepção do leite, respeitando no transporte as preconizações da cadeia de frio com controle de temperatura.

Ao chegar ao hospital, as amostras foram acondicionadas em congelador de leite cru e descongeladas, antes do processo de pasteurização. Após o descongelamento, a amostra foi aberta na presença de chama acesa, cheirado e inspecionado quanto a possíveis intercorrências (presença de substância flutuante ou cabelo). Caso não fosse encontrado nada alterado, realizava-se o processo de pasteurização.

Foram coletados 4 mL de cada amostra para a quantificação dos teores de fósforo, cálcio, magnésio, potássio e sódio. As amostras de leite foram acondicionadas em tubos de plástico estéreis e armazenadas em *freezer* com temperatura controlada entre -4 a -8°C, e encaminhadas para análise no Grupo de Espectrometria Atômica (GEAtom) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em cadeia de frio, onde as amostras permaneceram congeladas até o momento das análises.

Antes da análise, o leite foi previamente aquecido a 37°C em banho de água (banho-maria) para o descongelamento e homogeneização das amostras, que foram, em seguida, agitadas manualmente e transferidas, com o auxílio de uma pipeta automática, para frascos de politetrafluoretileno (Teflon®). Quando não ocorria a dissolução da caseína usava-se um vórtice de baixa rotação.

Em cada frasco foram pesados, em balança analítica de precisão, cerca de 0,5 g das amostras de leite. Cada amostra foi pesada em duplicata. Em seguida, os frascos foram transferidos para uma capela de exaustão, onde foram adicionados 1,5 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>, 65% m/m, Sigma Aldrich), 1,5 mL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% m/m, Merck) e 4,5 mL de água deionizada, em cada um dos frascos contendo as amostras, que foram posteriormente fechados e colocados em um forno de micro-ondas (Milestone, modelo ETHOS 1) e submetidos ao programa de aquecimento. Este programa de aquecimento incluiu tempo de rampa de 8 minutos e tempo de permanência de 10 minutos para temperatura de 120° C e tempo de rampa de 18 minutos e de permanência de 15 minutos para temperatura de 190° C.

Após o resfriamento das amostras, os frascos foram transferidos para a capela de fluxo laminar; abertos e transferidos para tubos de plástico de 15,0 mL e o volume das amostras foi completado para 14,0 mL com água deionizada.

As amostras foram analisadas em um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Perkin Elmer, modelo 8300). Os elementos cálcio, sódio e potássio foram determinados na visão radial, e

magnésio e fósforo na visão axial. As condições instrumentais utilizadas para a análise do leite são mostradas na tabela 3.

Das 75 amostras de leite inicialmente coletadas para cada tipo de leite (doadoras – pré-pasteurização; doadoras pós-pasteurização, leite cru de mães de RNPT), devido a problemas durante o processo, foi possível analisar, respectivamente 68, 68 e 72 amostras, totalizando 208 amostras testadas quanto à concentração de cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio, em duplicata (totalizando 416 amostras analisadas).

As variáveis demográficas e sociais dos dois grupos de mães foram expressas em porcentagem e média com desvio padrão e analisadas por teste de qui quadrado para as variáveis categóricas e teste t de Student para as contínuas.

Para análise estatística foram comparadas três tipos de amostras de leite e dois grupos de lactantes - mães de RN a termo doadoras de banco de leite em amostras antes de depois da pasteurização e mães de RNPT. Foram calculadas as médias, desvio padrões e intervalo de confiança de 95% da média. Para comparar a concentração dos nutrientes analisados nos três tipos de leite foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para determinar a variabilidade entre as médias em cada grupo. Foi utilizado o programa estatístico *Social Package for Social Sciences* – SPSS versão 20.0. O nível de significância aceito foi de 5%.

## Resultados

Não houve diferença estatística para os dados demográficos e sociais entre os dois grupos de mães: doadoras de leite a termo e pré-termo (Tabela 2).

Houve diferença estatística entre os dois grupos de mães para a idade gestacional e de peso ao nascimento, respectivamente:  $38,3 \pm 1,3$  e  $3.027 \pm 778$ g no grupo a termo e de  $33,1 \pm 3,0$  e  $2.065 \pm 738$ g nas crianças pré-termo ( $p < 0,001$ ).

Na avaliação da composição do leite de doadoras antes e após a pasteurização pode-se observar que a maioria dos elementos apresentou uma redução estatisticamente significativa após a pasteurização, com exceção do magnésio (Tabela 3). As amostras de leite analisadas antes da pasteurização também apresentaram teores de cálcio, fósforo e potássio significativamente maiores que as amostras coletadas à beira de leite. Para o magnésio, os valores encontrados nas distintas amostras foram similares. O sódio foi o único elemento encontrado em concentrações significativamente maiores nas amostras coletadas à beira de leite.

A tabela 4 mostra a relação entre os valores obtidos das concentrações dos eletrólitos e minerais no leite de mães de RNPT obtidos à beira do leite e os volumes de leite necessários para se atingir as suas necessidades diárias. Para o magnésio, sódio e potássio, o aumento progressivo do volume da mamada atingiu tal objetivo. Porém, para o cálcio e fósforo, mesmo com volumes elevados de leite, isso não foi conseguido.

## Discussão

Diversos fatores podem influenciar a composição do leite, que é bastante variada, principalmente quanto à presença de micronutrientes. Entre os fatores que podem afetar esta constituição estão: o período da lactação, ou seja, se colostro, leite de transição ou maduro; a constituição genética da mãe; o período do dia e a alimentação; além disso, pode variar de mulher para mulher e entre a mesma mulher.<sup>12,15,19-24</sup> Em contraponto, Bates e Prentice<sup>24</sup> afirmam em seu estudo que a oferta de cálcio, ferro, zinco e cobre na dieta da mãe não afeta a concentração destes minerais no leite humano. No presente estudo foi encontrada uma grande variedade de concentração de nutrientes, como, por exemplo, o observado na concentração de sódio, no leite colhido à beira do leito, que teve uma variação maior que duas vezes em relação àquele de leite de doadoras antes da pasteurização (337,7 mg/mL a 704,0 mg/mL).

Braga e Palhares<sup>7</sup> não encontraram alterações significativas na composição do leite humano após a pasteurização, afirmando que os componentes do leite permaneceram inalterados. Entretanto, os teores de cálcio e de fósforo não atingem os níveis recomendados em relação à nutrição do pré-termo. Isto não ocorreu no presente estudo, como já citado anteriormente, uma vez que todos os elementos estudados tiveram uma redução estatisticamente significativa, com exceção do magnésio. Já Souza e Silva<sup>25</sup> encontraram uma redução na composição dos macronutrientes e micronutrientes após a pasteurização, indicando a necessidade da fortificação do leite para suprir as necessidades do pré-termo.

Bortolozzo *et al*<sup>6</sup> observaram que os processos de armazenamento, pasteurização e congelamento reduzem os teores de nutrientes do leite

humano. Além disso, o leite de mães de RN pré-termo apresentou maiores teores de cálcio, potássio, sódio e zinco do que aquele de mães com leite maduro que tiveram parto em gestação a termo. Em nosso estudo somente o magnésio e o sódio foram encontrados em teores mais elevados. Tais diferenças poderiam ser atribuídas a um número menor de amostras de leite do trabalho citado (26 amostras de leite maduro, 10 de leite anterior e 10 amostras de leite de mães de RNPT) e ainda pelo fato dos autores terem incluído apenas amostras de leite pasteurizado e estocado, fato esse corroborado por Ballard e Morrow<sup>23</sup>

Underwood<sup>4</sup> também afirma que o leite de mães de RNPT contém mais sódio, gordura e proteína, entretanto a tendência, com o passar das semanas, é de queda desses valores. Os teores de zinco e de cobre também são mais elevados, enquanto os teores de cálcio são menores, o que coincide com o observado no presente estudo, no qual os teores de cálcio encontrados nas amostras após a pasteurização foram significativamente menores do que aqueles encontrados em amostras coletadas a beira de leite.

Morgano *et al*<sup>15</sup> pesquisaram a composição mineral do leite maduro de mães doadoras, entre 25 a 35 dias de lactação. Os teores médios (mg/L) dos elementos encontrados foram 263,5±64,7 para cálcio; 159,3±33,6 para fósforo; 489,8±132,7 para potássio; 207,2±149,6 para o sódio e 26,5±6,8 para magnésio, valores esses menores que os encontrados no presente estudo. A única exceção foi os valores maiores de fosforo. Os teores de cálcio, fósforo e potássio após a pasteurização também foram menores do que aqueles encontrados por Morgano *et al*,<sup>15</sup> ao contrário dos teores de sódio e magnésio, que foram maiores. No presente estudo, para o leite coletado à beira de leite,

os teores encontrados foram maiores para cálcio e fósforo e menores para magnésio, potássio e sódio.

Essas diferenças poderiam ser justificadas pelo fato de que o estudo de Morgano *et al.*<sup>15</sup> foi realizado com 151 amostras de leite maduro, sem distinção entre lactantes a termo ou não, se as amostras eram congeladas ou de leite cru e, ainda, se sofreram ou não processo de pasteurização.

A recomendação nutricional do *European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN)*<sup>26</sup> de 2010 para recém-nascidos pré-termo é de que a oferta diária de cálcio deve estar entre 110 a 130 mg/dia. No presente estudo, a média dos teores de cálcio determinados nas amostras coletadas à beira de leite foi de 197,3 mg/L. Considerando-se esse valor médio, um recém-nascido teria que ingerir mais de 0,5 L de leite materno por dia para atingir os valores de ingestão recomendados pela ESPGHAN. Mesmo considerando-se o maior teor de Ca encontrado em uma amostra coletada à beira de leite (242,5 mg/L), a oferta diária recomendada de cálcio só seria atingida com a ingestão de um alto volume de leite materno. Como o volume de leite ingerido por um recém-nascido pré-termo é limitado pelas suas condições clínicas, os teores de Ca seriam insuficientes para garantir as demandas nutricionais deste mineral.

Para o fósforo, a ingestão diária recomendada pela ESPGHAN é de 55 a 80 mg/dia. Considerando-se a média dos teores deste elemento encontrados em amostras coletadas à beira do leite (97,10 mg/L), também seria necessária a ingestão de um alto volume de leite pelos recém-nascidos. A deficiência do fósforo poderia determinar alterações no desenvolvimento cerebral e ósseo.<sup>26,27</sup>

Além disso, absorção e a biodisponibilidade de um dado elemento essencial na alimentação dependem fortemente da estrutura química específica desse elemento.<sup>19</sup> Estima-se que a média de absorção do cálcio e do fósforo varie entre 36 a 75% do que foi ingerido pelo recém-nascido pré-termo.<sup>3</sup>

Trindade<sup>3</sup> observou que o leite produzido no primeiro mês de vida da criança, tanto de mães de RNPT como aquelas que tiveram filhos a termo, apresentam concentrações similares de cálcio e fósforo e afirma que os teores não seriam suficientes para promover a mineralização dos ossos de recém-nascido pré-termo, sendo necessária a fortificação/suplementação do leite materno para suprir as deficiências que possam aparecer. Assim é possível observar a necessidade de um volume maior de leite para suprir o recomendado, sendo, portanto necessária a complementação do leite materno ofertado, conforme mostramos no nosso estudo.

Para o magnésio, os valores de ingestão diários recomendados são de 7,5 a 13,6 mg/dia. Considerando-se a média dos teores encontrados neste trabalho (47,3 mg/L), a ingestão diária de 180 mL pelo recém-nascido garantiria uma ingestão adequada deste nutriente.

Ao se avaliar as concentrações médias de sódio e potássio e suas respectivas taxas de recomendações diárias, a ingestão de 120 mL/dia de leite pelo recém-nascido já seria suficiente para garantir as demandas nutricionais destes dois elementos.<sup>26,27</sup>

Foi possível verificar no decorrer deste estudo que houve uma redução significativa da concentração da maioria dos nutrientes após as amostras de leite terem sido submetidas ao processo de estocagem, congelamento e

pasteurização. Mesmo com essa redução de teores dos eletrólitos, o que poderia ser superado pelo aumento do volume da oferta diária de leite ou pela suplementação de cálcio e fósforo, quando houver dosagem sérica menores que os padrões estabelecidos, a oferta de leite humano pasteurizado ao recém-nascido pré-termo extremos e/ou menores de 1.000 g ao nascer, traz mais benefícios do que receber ofertas maiores desses elementos oferecidos pela fórmulas lácteas especiais para o RNPT, pois sabidamente promove uma melhor maturação intestinal, previne a enterocolite necrosante e a sepse tardia.<sup>28,29</sup>

O estudo apresenta como ponto forte um número grande de amostras, bem acima de estudos prévios encontrados na literatura, o que permite uma validação externa dos resultados pois foi baseado em cálculo de tamanho amostral e não amostra de conveniência. Outro destaque é confirmação da necessidade de suplementação de cálcio e fósforo no leite humano de mães de RNPT. No entanto, não foi possível o pareamento dos resultados com a idade gestacional e tempo de puerpério devido à dificuldade de conseguir volume suficiente para as análises em detrimento à oferta para o recém-nascido.

A oferta do leite cru da própria mãe, respeitando os preceitos da cadeia de frio, e de não contaminação das amostras, poderia aumentar a possibilidade de oferta de leite humano nos hospitais com poucos recursos ou que ainda não possuem um banco de leite humano, trazendo inúmeros benefícios aos recém-nascidos pré-termo.

## Referências bibliográficas

1. Scochi CG. A humanização da assistência hospitalar ao bebê prematuro, bases teóricas para o cuidado de enfermagem. [Free-docency thesis]. Ribeirão Preto (SP):USP; 2000.
2. Rolim KM, Cardoso MV. O discurso e a prática do cuidado ao recém-nascido de risco: refletindo sobre a atenção humanizada. *Rev Latino-Am Enfermagem*. 2006;14:85-92.
3. Trindade CE. Importância dos minerais na alimentação do pré-termo extremo. *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81:S43-51.
4. Underwood MA. Human milk for the premature infant. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60:189-207.
5. Bhatia J. Human milk and the premature infant. *Ann Nutr Metab*. 2013;62 Suppl 3:8-14.
6. Bortolozo EA, Tiboni EB, Cândido LM. Leite humano processado em bancos de leite para o recém-nascido de baixo-peso: análise nutricional e proposta de um novo complemento. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;16:199-205.
7. Braga LP, Palhares DB. Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83:59-63.
8. Coperleijn WE, Vermeulen MJ, Akker CH, Goudoever JB. Feeding very-low-birth-weight infants: our aspirations versus the reality in practice. *Ann Nutr Metab*. 2011;58:20-9.
9. Ziegler EE. Meeting the nutritional needs of the low-birth-weight infant. *Ann Nutr Metab*. 2011;58:8-18.
10. Cooke R. Nutrition of Preterm Infants after discharge. *Ann Nutr Metab*. 2011;58:32-6.
11. Harding JE, Cormack BE, Alexander T, Alsweiler JM, Bloomfield FH. Advances in nutrition of the newborn infant. *Lancet*. 2017 Apr 22;389(10079):1660-8.
12. Tudehope DI. Human milk and the nutritional needs of preterm infants. *J Pediatr*. 2013;162 Suppl 3:S17-25.
13. Pessoto MA. Avaliação da lactação em mães de recém-nascido pré-termo com peso de nascimento inferior a 1.250 gramas segundo diferentes métodos de ordenha, manual, com bomba manual ou com bomba elétrica [PhD thesis]. Campinas:Unicamp; 2009.

14. Thomaz DM, Serafim PO, Palhares DB, Melnikov P, Venhofen L, Vargas MO. Comparação entre suplementos homólogos do leite humano e um suplemento. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88:119-24.
15. Morgano MA, Souza LA, Neto JM, Rondó PH. Composição mineral do leite materno de bancos de leite. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25:819-24.
16. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Epidemiologia clínica, elementos essenciais*. 4th ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 2006.
17. Hulley SB, Cummings SR, Browner WR, Grady DG, Newman TB. *Delineando a pesquisa clínica*. 3rd ed. São Paulo: Artmed AS; 2008.
18. Brazil - Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília: ANVISA; 2008.
19. St-Remy RR, Sanchez ML, Sastre JB, Sanz-medel A. Multielemental distribution patterns in premature human milk whey and pre-term formula milk whey by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octopole reaction cell. *J Anal At Spectrom*. 2004;19:1104-10.
20. Emmett PM, Rogers IS. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early Hum Dev*. 1997;49:S7-28.
21. Picciano MF. Nutrient composition of human milk. *Pediatr Clin North Am*. 2001;48:53-67.
22. Stam J, Saver PJ, Boehm G. Can we define an infant's need from the composition of human milk? *Am J Clin Nutr*. 2013;98:521S-8S.
23. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60:49-74.
24. Bates CJ, Prentice A. Breast milk as a source of minerals. *Pharmacol Ther*. 1994;62:193-220.
25. Souza PP, Silva JA. Monitoramento da qualidade do leite humano ordenhado e distribuído em banco de leite de referência. Monitoring the quality of human milk distributed by a reference milk bank. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69:7-14.
26. Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, Curtis M, Darmaun D, Decsi T, et al. Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50:85-91.
27. Tudehope D, Fewtrell M, Kashyap S, Udaeta E. Nutritional needs of the micropreterm infant. *J Pediatr*. 2013;162 Suppl 3:S72-80.

28.Sisk PM, Lambeth TM, Rojas MA, Lightbourne T, Barahona M, Anthony E, et al. Necrotizing Enterocolitis and Growth in Preterm Infants Fed Predominantly Maternal Milk, Pasteurized Donor Milk, or Preterm Formula: A Retrospective Study. *Am J Perinatol*. 2017 Jun;34(7):676-83.

29.Hair AB, Peluso AM, Hawthorne KM, Perez J, Smith DP, Khan JY, et al. Beyond necrotizing enterocolitis prevention: improving outcomes with an exclusive human milk-based diet. *Breastfeed Med*. 2016 Mar;11(2):70-4.

**Tabela 1-** Condições instrumentais usadas na espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado ( ICP-OES) para a análise das amostras de leite.

Parâmetro	Valor
Potência/W*	1400
Vazão do gás nebulizador/L min <sup>-1</sup>	0,70
Vazão do argônio auxiliar/L min <sup>-1</sup>	0,5
Vazão de argônio/L min <sup>-1</sup>	15
Vazão de aspiração de amostra/mL min <sup>-1</sup>	1,0
Tempo de <i>delay</i> /s	45
Comprimentos de onda/nm	Ca: 317,933 nm; P: 213,617 nm; Mg: 280,271 nm; Na: 589,592 nm; K: 766,40 nm

W: watts; nm: nanômetro.

**Tabela 2-** Distribuição percentual das características demográficas e sociais das mães doadoras a termo e de RNPT

Variável	Mães doadoras	Mães de RNPT	P*
Idade em anos	24,9±5,7	24,9±6,0	0,980
Cor branca	89,6%	84,6%	0,606
casada	76,4%	61,5%	0,261
Primigesta	54,8%	41,1%	0,098
Parto vaginal	26,7%	32,0%	0,473
Nível superior	12,3%	23,1%	0,303
Renda de 2 a 5 SM	90,5%	76,9%	0,156

Teste de qui-quadrado e t de Student

SM = salário mínimo

RNPT = recém-nascido pré-termo

Tabela 3- Valores das concentrações de cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio, expressos em mg/l, segundo os tipos de leite estudados

<b>Tipo de coleta (N)</b>	<b>Média±DP</b>	<b>IC 95% da média</b>		<b>P*</b>
<b>Cálcio</b>				
AP (68)	259,4±96,8	235,9	282,8	AP x P p=0,003
P (68)	217,0±54,9	203,6	230,3	P x BL p=0,273
BL (72)	197,4±67,7	181,4	213,3	AP x BL p<0,0001
<b>Fósforo</b>				
AP (68)	139,10±51,74	126,6	151,6	AP x P p=0,004
P (68)	116,8±33,3	108,7	124,9	P x BL p<0,0010
BL (72)	97,1±31,2	89,8	104,4	AP x BL p<0,0001
<b>Magnésio</b>				
AP (68)	45,7±13,0	42,6	48,9	AP x P p=0,335
P (68)	42,2±10,6	39,7	44,8	P x BL p=0,097
BL (72)	47,3±18,0	43,0	51,5	AP x BL p=0,797
<b>Sódio</b>				
AP (68)	337,7±317,9	260,8	414,7	AP x P p=0,532
P (68)	275,1±261,3	211,8	338,3	P x BL p<0,0001
BL (72)	704,0±417,5	605,9	802,1	AP x BL p<0,0001
<b>Potássio</b>				
AP (68)	580,8±177,1	538,0	623,7	AP x P p<0,0001
P (68)	470,9±109,4	444,4	497,4	P x BL p=0,153
BL (72)	515,7±133,0	484,4	546,9	AP x BL p=0,020

AP = antes da pasteurização P= após pasteurização BL banco de leite

DP= desvio padrão IC95% interval de confiança de 95%

\* ANOVA/teste de Tukey

Tabela 4- Quantidade de eletrólitos e minerais em mg/L de acordo com o volume de leite materno colhido de mães de pré-termo à beira de leito calculado a partir das necessidades recomendadas

Elemento	Ingestão recomendada (mg/dia)*	Teor médio determinado (mg/L)	Volume de leite ofertado por mamada (mL) a cada 3 horas						
			5	10	15	20	25	30	60
			Ca	110 a 130	197,4	7,8	15,7	23,6	31,5
P	55 a 80	97,1	3,8	7,7	11,6	15,5	19,4	23,3	46,6
Mg	7,5 a 13,6	47,3	1,8	3,7	5,6	<b>7,5</b>	<b>9,4</b>	<b>11,3</b>	<b>22,7</b>
Na	63 a 105	704	28,1	56,3	<b>84,4</b>	<b>112,6</b>	<b>140,8</b>	<b>168,9</b>	<b>337,9</b>
K	60 a 120	515,7	20,6	41,2	<b>61,8</b>	<b>82,5</b>	<b>103,1</b>	<b>123,7</b>	<b>247,5</b>

- Ingestão diária recomendada por ESPGHAN (European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) <sup>26</sup>. Em negrito destaca-se o volume necessário para se obter a ingestão recomendada.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### **Termo de consentimento livre e esclarecido**

**Título da pesquisa:** Comparação da propriedade microbiológica e físico-química do leite humano cru coletado em beira de leito, no domicílio e após pasteurização.

**Pesquisadores responsáveis:** Carla Regina Bianchi Codo

Prof Dr Sérgio Tadeu Martins Marba

**Número do CAAE:** 35545314.4.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo. Como também nenhum gasto ou pagamentos.

#### **Justificativa e objetivos:**

Justifica-se este estudo pela necessidade de se aprofundar o conhecimento sobre a composição microbiológica e físico-química do leite humano cru a ser ofertado ao prematuro que pode aumentar a quantidade de leite a ser oferecida ao mesmo.

O objetivo é: Comparar a composição microbiológica e físico-química do leite humano cru ordenhado em beira de leito, na unidade de terapia intensiva neonatal, com o ordenhado em domicílio e após a pasteurização.

**Procedimentos:**

Participando do estudo você está sendo convidado a ter sua glândula mamária ordenhada, manualmente, respeitando a sua privacidade, na sala de amamentação, pela Mestre em Enfermagem em Saúde da Mulher e pesquisadora deste estudo ou pelas enfermeiras da unidade neonatal.

Seu leite será coletado e encaminhado para a análise da presença de microrganismos (fungos e bactérias) no laboratório da Santa Casa de Limeira, e análise de seus componentes no Banco de Leite da Santa Casa. Este procedimento pode ser repetido até três (3) vezes.

**Desconfortos e riscos:**

O desconforto é mínimo e esta relacionado a ordenha da mama. Não há riscos a sua saúde ou integridade física.

**Benefícios:**

O benefício será a possibilidade de uma maior oferta de leite ao prematuro ao final desta pesquisa.

**Acompanhamento e assistência:**

Caso seja detectado algum indício de processo infeccioso, em sua mama ou leite, você será encaminhada para a assistência adequada pelo médico da unidade neonatal da Santa Casa mediante avaliação da pesquisadora.

**Sigilo e privacidade:**

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe

de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

**Ressarcimento:**

A coleta será efetuada no momento de sua estadia na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal da Santa casa de Limeira. Não haverá nenhum gasto ou ressarcimento pela sua participação.

**Contato:**

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisadores Carla Regina Bianchi Codo: Av Antonio Ometto, nº 645, na Unidade Neonatal. Telefone: (19) 34970276. E-mail: [carlacodo@yahoo.com.br](mailto:carlacodo@yahoo.com.br)

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP: Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

**Consentimento livre e esclarecido:**

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu responsável LEGAL)

**Responsabilidade do Pesquisador:**

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado.

Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.  
(Assinatura do pesquisador)

## ANEXO 2

TABELAS DE RESULTADO DO TESTE DE CALDO BILE VERDE  
BRILHANTE LACTOSE (BGBL)

TABELA DE ACOMPANHAMENTO DE RESULTADOS DO **BGBL**

Tabela 12: Resultado do BGBL Antes da Pasteurização (AP)

Identificação	4%	5%
AP01	Contaminado	Contaminado
AP02	Não contaminado	Não contaminado
AP03	Contaminado	Contaminado
AP04	Contaminado	Contaminado
AP05	Contaminado	Contaminado
AP06	Contaminado	Contaminado
AP07	Contaminado	Contaminado
AP08	Contaminado	Contaminado
AP09	Não contaminado	Não contaminado
AP10	Contaminado	Contaminado
AP11	Contaminado	Contaminado
AP12	Contaminado	Contaminado
AP13	Não contaminado	Não contaminado
AP14	Contaminado	Contaminado
AP15	Contaminado	Contaminado
AP16	Contaminado	Contaminado
AP17	Contaminado	Contaminado
AP18	Contaminado	Contaminado
AP19	Contaminado	Contaminado
AP20	Não contaminado	Não contaminado
AP21	Contaminado	Contaminado

---

AP22	Contaminado	Contaminado
AP23	Contaminado	Contaminado
AP24	Não contaminado	Não contaminado
AP25	Não contaminado	Não contaminado
AP26	Contaminado	Contaminado
AP27	Não contaminado	Não contaminado
AP28	Contaminado	Contaminado
AP29	Contaminado	Contaminado
AP30	Contaminado	Contaminado
AP31	Não contaminado	Não contaminado
AP32	Contaminado	Contaminado
AP33	Contaminado	Contaminado
AP34	Contaminado	Contaminado
AP35	Contaminado	Contaminado
AP36	Contaminado	Contaminado
AP37	Contaminado	Contaminado
AP38	Perda (vidro quebrou)	Perda
AP39	Não contaminado	Não contaminado
AP40	Contaminado	Contaminado
AP41	Contaminado	Contaminado
AP42	Contaminado	Contaminado
AP43	Não contaminado	Não contaminado
AP44	Não contaminado	Não contaminado
AP45	Contaminado	Contaminado
AP46	Contaminado	Contaminado
AP47	Perda (vidro quebrou)	Perda
AP48	Perda (vidro quebrou)	Perda
AP49	Não contaminado	Não contaminado
AP50	Não contaminado	Não contaminado

---

---

AP51	Não contaminado	Não contaminado
AP52	Contaminado	Contaminado
AP53	Contaminado	Contaminado
AP54	Não contaminado	Não contaminado
AP55	Contaminado	Contaminado
AP56	Contaminado	Contaminado
AP57	Contaminado	Contaminado
AP58	Contaminado	Contaminado
AP59	Contaminado	Contaminado
AP60	Contaminado	Contaminado
AP61	Não contaminado	Não contaminado
AP62	Contaminado	Contaminado
AP63	Não contaminado	Não contaminado
AP64	Não contaminado	Não contaminado
AP65	Não contaminado	Não contaminado
AP66	Não contaminado	Não contaminado
AP67	Não contaminado	Não contaminado
AP68	Contaminado	Contaminado
AP69	Contaminado	Contaminado
AP70	Contaminado	Contaminado
AP71	Não contaminado	Não contaminado
AP72	Não contaminado	Não contaminado
AP73	Não contaminado	Não contaminado
AP74	Não contaminado	Não contaminado
AP75	Contaminado	Contaminado

---

Tabela 13: Resultado do BGBL do leite Pasteurizado (P)

Identificação	4%	5%
P01	Não contaminado	Não contaminado
P02	Não contaminado	Não contaminado
P03	Não contaminado	Não contaminado
P04	Não contaminado	Não contaminado
P05	Não contaminado	Não contaminado
P06	Vidro quebrou	
P07	Não contaminado	Não contaminado
P08	Não contaminado	Não contaminado
P09	Não contaminado	Não contaminado
P10	Vidro quebrou	
P11	Não contaminado	Não contaminado
P12	Não contaminado	Não contaminado
P13	Vidro quebrou	
P14	Não contaminado	Não contaminado
P15	Não contaminado	Não contaminado
P16	Não contaminado	Não contaminado
P17	Não contaminado	Não contaminado
P18	Não contaminado	Não contaminado
P19	Não contaminado	Não contaminado
P20	Não contaminado	Não contaminado
P21	Não contaminado	Não contaminado
P22	Não contaminado	Não contaminado
P23	Não contaminado	Não contaminado
P24	Não contaminado	Não contaminado
P25	Não contaminado	Não contaminado
P26	Não contaminado	Não contaminado

---

P27	Vidro quebrou	
P28	Não contaminado	Não contaminado
P29	Não contaminado	Não contaminado
P30	Não contaminado	Não contaminado
P31	Não contaminado	Não contaminado
P32	Não contaminado	Não contaminado
P33	Não contaminado	Não contaminado
P34	Não contaminado	Não contaminado
P35	Não contaminado	Não contaminado
P36	Não contaminado	Não contaminado
P37	Não contaminado	Não contaminado
P38	Não contaminado	Não contaminado
P39	Não contaminado	Não contaminado
P40	Não contaminado	Não contaminado
P41	Não contaminado	Não contaminado
P42	Não contaminado	Não contaminado
P43	Não contaminado	Não contaminado
P44	Não contaminado	Não contaminado
P45	Vidro quebrou	
P46	Não contaminado	Não contaminado
P47	Não contaminado	Não contaminado
P48	Não contaminado	Não contaminado
P49	Não contaminado	Não contaminado
P50	Não contaminado	Não contaminado
P51	Não contaminado	Não contaminado
P52	Não contaminado	Não contaminado
P53	Não contaminado	Não contaminado
P54	Não contaminado	Não contaminado
P55	Contaminado	Contaminado

---

P56	Vidro quebrou	
P57	Não contaminado	Não contaminado
P58	Não contaminado	Não contaminado
P59	Não contaminado	Não contaminado
P60	Não contaminado	Não contaminado
P61	Não contaminado	Não contaminado
P62	Não contaminado	Não contaminado
P63	Presença de cabelo	
P64	Não contaminado	Não contaminado
P65	Não contaminado	Não contaminado
P66	Não contaminado	Não contaminado
P67	Não contaminado	Não contaminado
P68	Não contaminado	Não contaminado
P69	Não contaminado	Não contaminado
P70	Não contaminado	Não contaminado
P71	Não contaminado	Não contaminado
P72	Não contaminado	Não contaminado
P73	Não contaminado	Não contaminado
P74	Vidro quebrou	
P75	Não contaminado	Não contaminado

Tabela 14: Resultado do BGBL do leite obtido em Beira de leite

Identificação	4%	5%	Assepsia	Origem
BL 01	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH
BL 02	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	NEO
BL 03	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	NEO

BL 04	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	ACT
BL 05	Amostra Insuficiente	Amostra Insuficiente	Sem assepsia	ACT
BL 06	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	NEO
BL 07	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	NEO
BL 08	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	ACT
BL 09	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	NEO
BL 10	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	NEO
BL 11	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	ACT
BL 12	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	NEO
BL 13	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	ACT
BL 14	Perda (vidro quebrou)	Perda (vidro quebrou)	Sem assepsia	ACT
BL 15	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 16	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	NEO
BL 17	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 18	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	NEO
BL 19	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	NEO
BL 20	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	ACT
BL 21	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 22	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)

BL 23	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 24	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 25	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 26	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 27	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 28	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 29	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 30	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 31	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 32	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	NEO
BL 33	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	NEO
BL 34	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	NEO
BL 35	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 36	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 37	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 38	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH

---

				(ACT)
BL 39	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 40	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 41	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 42	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 43	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 44	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 45	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 46	Contaminado	Contaminado	Assepsia	NEO
BL 47	Contaminado	Contaminado	Assepsia	NEO
BL 48	Não contaminado	Não contaminado	Assepsia	NEO
BL 49	Não contaminado	Não contaminado	Assepsia	NEO
BL 50	Não contaminado	Não contaminado	Assepsia	NEO
BL 51	Não contaminado	Não contaminado	Assepsia	NEO
BL 52	Não contaminado	Não contaminado	Assepsia	NEO
BL 53	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 54	Não	Não	Sem assepsia	BLH

	contaminado	contaminado		(ACT)
BL 55	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 56	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 57	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 58	Não contaminado	Não contaminado	Assepsia	NEO
BL 59	Não contaminado	Não contaminado	Assepsia	NEO
BL 60	Contaminado	Contaminado	Assepsia	NEO
BL 61	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (ACT)
BL 62	Não contaminado	Não contaminado	Assepsia	NEO
BL 63	Contaminado	Contaminado	Assepsia	NEO
BL 64	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 65	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 66	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 67	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 68	Contaminado	Contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 69	Não contaminado	Não contaminado	Sem assepsia	BLH (NEO)
BL 70	Não	Não	Sem assepsia	BLH

---

	contaminado	contaminado		(NEO)
BL 71	Não	Não	Assepsia	NEO
	contaminado	contaminado		
BL 72	Não	Não	Assepsia	ACT
	contaminado	contaminado		
BL 73	Não	Não	Assepsia	ACT
	contaminado	contaminado		
BL 74	Não	Não	Sem assepsia	BLH
	contaminado	contaminado		(ACT)
BL 75	Não	Não	Sem assepsia	BLH
	contaminado	contaminado		(NEO)

---

## ANEXO 3

Tabelas dos resultados dos minerais e eletrólitos no leite obtido de mães doadoras de leite do banco de leite antes e depois da pasteurização e de mães de bebês prematuros colhidas em beira de leito.

Tabela 15: Concentração de Fósforo em mg/L de acordo com o tipo de amostra

Identificação	AP		P		BL	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
01	----	-----	121,19	0,40	86,36	6,42
02	158,67	4,34	110,04	1,00	114,38	5,47
03	143,71	5,22	152,97	1,04	101,45	1,44
04	191,00	2,14	151,11	3,90	85,42	2,71
05	----	-----	139,32	5,11	-----	-----
06	130,74	2,36	123,66	0,42	65,49	2,82
07	119,83	0,05	118,45	3,65	78,65	4,83
08	61,65	0,80	70,25	4,31	110,21	2,79
09	79,91	0,35	92,33	5,23	100,72	2,01
10	134,19	5,84	64,75	1,22	38,44	1,08
11	150,06	4,33	121,73	1,79	135,80	3,24
12	193,88	5,28	166,81	0,84	89,68	3,07
13	95,22	0,06	----	----	130,39	15,60
14	127,67	2,46	124,52	0,79	102,05	12,34
15	113,79	0,26	133,38	1,48	59,35	2,33
16	162,01	1,66	134,94	7,79	41,21	1,26
17	148,30	3,68	88,35	0,69	180,88	2,40
18	139,35	2,03	146,96	1,10	104,16	2,13
19	89,33	5,91	95,49	0,89	133,98	4,58

---

20	137,35	4,73	80,25	1,35	171,60	0,58
21	140,96	4,67	110,37	1,47	64,54	0,83
22	184,26	4,49	99,24	2,77	82,13	2,84
23	187,57	8,43	99,24	1,40	71,88	5,20
24	150,51	1,92	107,38	0,21	108,72	0,02
25	143,37	5,07	92,61	1,47	67,11	1,59
26	174,67	8,26	113,96	0,50	46,90	1,23
27	184,55	2,88	----	----	106,84	0,05
28	146,08	1,03	121,24	0,44	92,32	1,70
29	71,34	3,76	52,64	0,18	113,97	1,40
30	167,23	2,40	116,56	0,87	90,53	2,04
31	224,91	4,27	149,42	0,99	92,89	2,05
32	97,45	5,36	93,56	2,18	59,29	0,18
33	176,04	8,61	185,64	2,15	----	----
34	150,42	5,18	123,52	6,71	----	----
35	127,83	1,22	151,62	4,24	75,28	0,44
36	200,94	3,58	134,54	1,48	71,101	0,25
37	132,61	4,63	80,142	0,469	57,28	1,34
38	163,30	1,94	115,05	6,42	78,002	0,33
39	109,38	1,07	115,05	6,42	94,83	0,15
40	154,35	2,02	90,14	4,45	139,74	2,49
41	210,32	1,67	101,61	3,06	63,21	1,83
42	156,56	2,89	78,72	2,46	134,82	4,64
43	201,95	6,35	71,94	1,36	125,10	0,15
44	----	----	174,85	0,58	100,92	2,37
45	----	----	189,15	6,52	126,55	3,89
46	----	----	----	----	106,88	0,22
47	----	----	----	----	78,63	1,37
48	----	----	----	----	83,57	0,19

---

---

49	80,76	0,43	79,61	0,82	40,87	2,42
50	99,28	5,86	94,56	1,95	67,63	0,04
51	125,56	1,63	93,81	4,40	110,147	0,25
52	140,76	3,73	133,85	0,30	109,59	0,61
53	125,44	2,05	131,95	0,36	117,72	0,25
54	177,80	0,99	157,40	1,48	72,46	0,58
55	414,35	7,19	153,02	3,77	73,67	5,73
56	115,02	1,17	121,75	0,01	134,18	7,52
57	199,09	3,51	155,10	1,82	88,30	3,36
58	116,13	4,13	121,52	0,12	130,26	14,99
59	114,73	1,25	110,75	1,21	93,097	8,21
60	108,86	2,47	77,61	7,08	91,87	20,18
61	111,33	29,80	106,02	3,70	100,102	0,15
62	94,64	2,00	71,54	1,05	151,24	2,10
63	105,64	7,85	123,50	0,17	125,20	9,17
64	99,23	1,24	----	----	79,60	0,69
65	57,93	2,24	83,22	1,19	72,09	0,48
66	93,94	0,014	151,84	10,34	124,51	5,63
67	110,99	3,44	149,74	7,64	59,23	1,69
68	95,68	0,004	76,84	28,75	103,06	0,03
69	138,03	4,01	99,09	1,54	71,43	2,70
70	127,06	3,64	168,04	4,56	93,13	0,52
71	97,35	0,01	130,31	1,74	85,39	4,23
72	62,83	0,93	45,32	3,69	101,048	0,39
73	196,42	1,98	198,77	7,45	140,24	1,31
74	112,72	2,98	----	----	180,47	15,24
75	104,47	1,48	101,84	1,93	111,70	6,20

---

Tabela 16: Concentração de Cálcio em mg/L de acordo com o tipo de amostra

Identificação	AP		P		BL	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
01	----	-----	216,68	8,45	206,35	17,02
02	306,92	1,01	198,61	2,27	121,672	6,8
03	266,58	5,33	299,08	3,83	260,09	8,46
04	342,134	5,02	255,84	4,075	130,86	2,02
05	----	-----	257,94	8,35	-----	-----
06	307,32	0,28	256,644	0,90	64,003	2,22
07	320,80	0,93	280,29	12,98	109,83	7,07
08	192,70	5,49	194,63	12,15	102,10	4,41
09	191,00	1,11	196,21	9,07	99,97	1,80
10	330,98	2,76	125,82	0,29	76,98	1,85
11	310,39	7,63	207,53	0,74	201,22	3,60
12	264,21	21,40	253,74	2,72	182,72	8,46
13	95,22	0,06	----	----	188,32	21,39
14	285,30	25,09	232,85	3,67	200,55	26,38
15	237,44	5,41	264,625	0,06	128,98	4,75
16	330,39	0,97	268,12	17,20	168,01	7,93
17	433,76	10,89	256,731	4,25	342,16	8,32
18	274,78	7,76	246,93	11,35	210,03	4,22
19	146,79	8,77	129,89	2,48	222,81	3,56
20	303,19	4,61	177,24	6,83	380,72	8,26
21	258,87	10,41	195,39	3,61	228,62	1,42
22	397,77	14,22	193,80	0,89	139,49	1,77
23	405,77	0,52	207,17	5,37	121,80	6,54
24	284,26	1,36	186,24	2,32	344,33	2,94

---

25	304,64	15,40	189,55	0,80	134,42	3,80
26	318,59	6,40	210,064	0,66	193,59	2,05
27	322,05	16,46	----	----	331,35	1,57
28	273,82	8,85	253,235	3,14	247,35	1,87
29	239,60	27,98	187,29	1,61	211,87	3,48
30	351,84	5,46	257,36	4,62	231,847	8,48
31	382,66	4,27	260,05	5,19	241,74	2,56
32	125,24	8,46	114,51	3,33	189,41	4,16
33	290,91	10,20	186,63	2,24	----	----
34	249,87	2,13	214,39	0,34	----	----
35	215,94	10,252	192,81	4,97	187,77	3,76
36	375,61	3,23	182,84	3,36	280,27	2,05
37	251,47	7,82	140,72	0,85	211,55	4,27
38	322,45	4,43	236,03	7,21	245,64	0,84
39	100,44	1,16	240,50	10,16	204,396	1,59
40	337,17	0,64	117,56	4,15	246,42	3,72
41	395,23	8,09	236,50	6,30	169,33	0,30
42	233,861	2,18	170,77	4,72	218,68	6,63
43	338,12	13,06	154,28	5,16	185,26	3,15
44	----	----	280,93	7,86	196,35	7,08
45	----	----	324,27	10,77	226,17	13,04
46	----	----	----	----	182,818	4,94
47	----	----	----	----	139,53	2,41
48	----	----	----	----	173,366	1,39
49	150,56	1,93	176,04	1,74	134,54	8,68
50	175,78	20,16	174,83	4,86	120,53	1,33
51	260,451	4,15	186,70	9,96	145,334	1,47
52	286,78	10,83	333,01	27,01	204,42	3,73
53	268,62	6,52	296,37	0,09	321,01	1,06

---

---

54	266,99	7,57	246,91	1,28	158,629	1,85
55	628,83	0,32	207,48	1,57	203,95	19,17
56	140,35	2,11	281,85	1,38	242,81	12,40
57	427,75	2,51	332,39	1,35	181,61	9,69
58	219,81	5,47	240,34	1,86	158,60	12,46
59	270,22	14,37	279,06	3,66	97,45	11,91
60	205,81	0,23	172,96	14,62	103,47	20,58
61	181,89	12,49	248,98	17,64	210,88	1,94
62	168,58	2,36	149,92	10,01	220,24	3,21
63	191,50	7,59	245,48	0,79	93,34	4,27
64	183,37	1,84	----	----	318,52	4,22
65	144,90	7,34	220,08	4,14	280,73	2,56
66	120,30	15,68	163,343	6,49	241,75	2,47
67	152,61	19,07	163,74	0,17	86,55	0,69
68	90,70	1,03	140,10	23,79	201,53	4,62
69	179,516	4,86	127,39	4,93	171,30	9,44
70	256,25	7,53	306,88	9,30	201,75	2,13
71	93,67	0,96	128,81	5,74	270,72	1,77
72	190,52	2,62	153,59	20,08	293,87	3,73
73	255,146	8,81	264,56	8,17	188,24	0,91
74	165,00	3,16	----	----	261,995	4,57
75	246,03	0,53	260,32	7,23	188,34	7,58

---

Tabela 17: Concentração de Magnésio em mg/ml de acordo com o tipo de amostra

Identificação	AP		P		BL	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
01	----	-----	56,18	1,07	42,84	3,24
02	47,75	0,33	39,16	0,16	38,09	1,68
03	30,09	0,40	37,88	0,75	36,42	0,64
04	49,38	1,32	43,70	0,22	36,43	1,16
05	----	-----	50,25	0,45	-----	-----
06	50,99	3,25	41,81	0,008	33,91	1,29
07	58,65	0,56	49,86	2,41	51,82	2,50
08	59,49	1,05	62,15	4,12	106,58	3,41
09	42,55	0,16	44,73	1,56	100,52	0,73
10	73,28	3,12	33,84	0,03	40,57	0,87
11	38,20	20,13	34,80	0,03	34,83	0,97
12	37,83	2,38	39,17	0,95	50,59	1,67
13	84,17	3,60	----	----	36,65	4,25
14	36,50	0,62	33,36	0,64	34,18	5,44
15	33,80	0,83	35,79	0,52	21,42	0,38
16	39,52	1,27	36,59	1,85	37,71	1,21
17	72,98	1,37	53,72	0,14	55,70	0,60
18	49,33	0,36	44,40	0,27	52,34	0,74
19	33,38	2,61	32,33	0,47	38,98	1,61
20	58,92	2,29	46,81	1,60	64,46	0,46
21	43,14	1,22	39,96	0,39	71,03	1,04
22	58,25	1,30	37,90	0,22	28,99	0,79
23	64,14	3,85	41,45	1,10	64,08	2,70
24	35,65	0,32	27,32	0,11	39,92	0,36

---

25	58,22	2,27	45,39	0,46	25,10	0,55
26	40,94	5,69	28,91	0,16	50,52	0,07
27	45,19	6,57	----	----	38,60	0,45
28	36,93	0,47	36,95	0,52	40,29	0,58
29	54,19	5,00	46,79	0,012	70,95	0,87
30	60,35	1,70	47,57	0,67	39,13	0,89
31	65,70	0,72	48,37	0,12	40,04	0,95
32	45,96	2,75	42,53	0,97	40,44	0,06
33	46,71	2,08	29,67	0,28	----	----
34	41,11	0,57	37,43	0,56	----	----
35	27,41	0,41	32,35	1,08	40,68	0,14
36	57,45	0,22	30,59	0,76	47,11	0,12
37	35,38	1,00	24,62	0,24	58,64	0,92
38	45,54	0,17	36,82	1,82	53,31	0,011
39	35,25	0,39	36,62	1,62	48,79	0,10
40	59,63	0,88	34,49	2,39	50,21	0,20
41	50	1,28	45,88	2,25	107,85	0,65
42	54,32	0,06	26,49	0,79	46,07	1,17
43	74,35	1,60	44,44	1,26	34,63	0,29
44	----	----	74,24	0,68	36,44	0,86
45	----	----	76,72	2,73	48,99	1,19
46	----	----	----	----	40,03	0,36
47	----	----	----	----	41,86	1,15
48	----	----	----	----	49,10	0,15
49	54,73	0,005	65,57	0,35	50,08	3,29
50	29	2,88	30,32	0,20	36,88	0,03
51	43,27	0,71	32,97	1,93	88,76	0,27
52	43,60	0,97	47,82	0,16	99,05	0,80
53	42,68	0,62	49,59	0,21	39,70	0,25

---

---

54	32,62	0,57	31,58	0,24	38,86	1,09
55	68,71	1,57	25,70	0,24	39,03	4,83
56	33,39	0,49	46,90	0,17	40,15	2,35
57	59,78	1,30	52,57	2,11	43,13	1,76
58	30,51	0,005	34,71	0,57	35,19	5,04
59	49,17	0,009	51,66	0,50	23,91	2,95
60	38,47	0,06	36,40	3,52	31,57	7,09
61	31,83	4,75	43,42	2,76	50,09	0,29
62	38,50	1,29	38,07	1,95	42,40	0,93
63	33,78	3,08	43,76	0,69	24,26	0,54
64	31,82	0,11	----	----	49,67	1,08
65	44,65	0,93	53,04	0,12	60,77	1,14
66	32,22	0,28	48,13	2,37	49,08	1,27
67	33,23	1,77	51,75	4,53	55,79	0,07
68	32,68	0,22	40,97	0,74	47,55	0,14
69	46,23	1,10	35,21	0,87	37,08	1,17
70	50,31	0,55	61,11	2,15	49,04	1,62
71	33,69	0,41	44,19	1,35	28,96	0,33
72	36,80	0,63	31,96	4,13	48,21	0,98
73	35,05	3,69	35,23	0,98	32,23	0,50
74	23,53	1,97	----	----	39,66	1,16
75	45,60	0,37	49,65	1,69	29,35	0,98

---

Tabela 18: concentração de Sódio em mg/ml de acordo com o tipo de amostra

Identificação	AP		P		BL	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
01	----	-----	357,32	11,31	293,28	22,16
02	114,26	0,65	88,44	2,16	351,94	13,31
03	194,79	2,26	189,05	3,21	269,78	5,79
04	132,66	1,46	109,77	3,17	909,89	31,41
05	----	-----	389,97	6,77	-----	-----
06	212,99	5,33	164,60	0,62	691,18	16,35
07	148,84	2,17	116,27	5,29	1631,42	66,32
08	532,63	12,96	490,18	28,57	978,70	32,45
09	330,36	2,30	296,33	12,60	966,28	5,66
10	445,16	9,68	155,50	2,79	1447,61	38,82
11	704,16	8,18	413,30	1,34	169,73	1,35
12	369,63	20,01	369,13	0,99	1037,73	40,32
13	1829,2	20,90	----	----	311,14	34,36
14	187,40	10,56	123,50	0,17	368,51	32,92
15	124,31	3,17	136,96	1,39	553,04	18,09
16	160,13	0,08	136,17	7,96	999,99	49,90
17	189,74	3,58	130,31	0,29	160,88	0,51
18	118,31	1,45	112,53	3,63	924,60	21,30
19	108,71	5,16	114,65	4,61	143,64	0,84
20	155	3,45	124,86	4,82	309,62	1,79
21	118,49	3,80	95,88	2,23	1773,82	21,57
22	190,08	8,41	128,21	1,60	152,37	7,97
23	259,03	20,69	161,53	2,73	1219,13	67,87
24	61,49	0,38	42,16	0,41	649,72	6,05

---

25	178,06	8,47	134,21	0,26	691,71	14,84
26	398,26	184,21	313,22	1,79	909,90	5,75
27	316,12	275,71	----	----	626,49	1,57
28	162,09	2,25	140,57	0,20	502,76	0,60
29	1472,5	162,41	1177,36	6,27	517,75	3,76
30	262,334	1,94	191,39	1,49	938,46	20,64
31	158,40	0,59	102,88	1,62	983,35	12,29
32	1084,24	57,49	878,99	16,94	1154,74	20,04
33	455,46	14,43	161,72	1,41	----	----
34	515,97	10,51	484,43	11,54	----	----
35	57,57	3,41	189,08	3,85	1001,15	1,14
36	141,31	0,53	179,82	1,82	1336,92	3,86
37	128,93	3,59	66,55	1,06	1823,54	8,07
38	150,56	1,06	112,56	2,22	1052,87	0,80
39	321,77	4,12	114,01	3,82	412,86	1,31
40	273,38	1,17	410,67	17,91	504,49	10,84
41	103,96	2,17	191,40	5,62	749,92	0,82
42	301,61	2,44	60,29	1,88	743,81	18,87
43	376,37	12,09	1378,51	28,56	214,57	5,88
44	----	----	280,08	4,62	402,82	4,74
45	----	----	321,38	10,60	548,91	34,18
46	----	----	----	----	287,18	4,36
47	----	----	----	----	345,83	1,29
48	----	----	----	----	448,93	3,76
49	342,74	4,13	318,26	0,51	1025,38	43,09
50	83,29	5,03	67,05	2,02	789,21	8,28
51	147,21	4,65	76,58	3,38	1104,28	12,56
52	151,46	2,47	126,73	3,61	1119,02	22,28
53	135,11	0,98	113,31	0,55	454,99	1,38

---

---

54	256,92	11	196,44	1,71	784,54	10,58
55	485,91	13,33	156,31	0,07	942,92	50,76
56	124,03	1,84	599,41	2,50	574,28	18,58
57	162,49	0,65	126,36	1,35	282,97	10,61
58	56,93	1,22	50,47	0,68	340,06	15,24
59	1334,22	20,87	743,02	12,80	191,34	16,28
60	177,46	1,40	130,51	0,52	508,36	410,66
61	584,24	273,47	113,64	7,89	714,78	7,66
62	220,60	0,46	167,01	13,15	204,94	0,03
63	112,19	3,89	87,27	0,03	206,19	7,19
64	107,83	0,40	----	----	837,11	1,76
65	1005,78	39,95	690,58	0,49	1356,92	9,42
66	343,95	1,80	262,54	21,37	606,04	14,07
67	327,74	14,87	290,60	69,33	1475,54	15,45
68	346,73	3,09	524,03	250,47	428,22	11,96
69	313,86	7,97	260,63	8,82	1361,92	74,47
70	117,46	4,94	124,65	2,03	683,95	8,04
71	547,46	3,68	391,37	10,74	600,04	13,80
72	1409,64	25,91	913,79	77,32	745,52	1,17
73	365,42	0,92	239,57	7,08	202,31	1,08
74	288,18	2,20	----	----	351,37	10,64
75	864,92	0,94	659,38	1,17	285,68	20,21

---

Tabela 19: concentração de potássio em mg/ml de acordo com o tipo de amostra

Identificação	AP		P		BL	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
01	----	-----	434,86	11,53	342,87	27,24
02	552,79	3,22	444,24	1,04	566,33	23,87
03	510,86	10,32	520,95	1,46	441,88	12,46
04	545,28	6,87	445,97	3,86	342,45	12,47
05	----	-----	636,78	13,97	-----	-----
06	426,94	11,09	444,16	2,09	486,42	10,34
07	385,32	2,05	407,11	18,93	294,14	13,07
08	335,43	3,32	421,50	23,95	420,75	10,94
09	335,44	7,39	403,98	16,70	411,86	0,14
10	600,02	13,50	242,79	3,36	275,30	7,05
11	807,96	7,56	669,56	6	569,20	10,25
12	814,09	45,69	638,82	3,15	373,91	12,60
13	427,46	1,32	----	----	547,30	65,36
14	647,02	37,05	481,72	3,90	447,97	42,46
15	455,55	2,80	513,77	3,88	456,13	13,72
16	570,50	3,15	504,78	29,07	251,19	11,89
17	624,99	12,45	435,12	11,02	609,45	9,18
18	402,81	1,36	393,77	13,45	419,55	6,78
19	402,42	17,67	438,19	1,65	581,67	9,59
20	581,92	14,35	455,85	14,62	765,09	12,20
21	549,52	19,41	456,21	12,50	378,45	5,24
22	606,76	25,75	395,04	8,16	350,15	12,70
23	627,90	28,45	418,27	5,08	505,76	28,69
24	601,08	8,57	461,99	4,77	650,23	6,18

---

25	436,83	19,42	327,40	1,77	490,27	11,92
26	768,71	63,78	605,33	4,84	491,36	2,54
27	754,29	119,49	----	----	627,90	1,81
28	527,28	3,67	492,40	4,17	452,26	0,29
29	386,68	44,16	323,86	0,64	433,46	2,80
30	586,50	12,35	476,80	5,72	610,20	13,84
31	566,25	5,88	404,69	7,79	638,32	13,06
32	545,74	29,94	472,41	10,05	478,44	6,88
33	702,56	23,04	469,70	7,01	----	----
34	601,77	12,78	510,93	13,35	----	----
35	489,97	13	449,46	9,22	419,60	0,84
36	790,20	13,90	433,77	3,16	399,65	3,50
37	497,67	15,94	291,15	1,21	392,90	9,50
38	597,57	0,18	475,05	15,58	558,23	4,31
39	326,16	4,59	480,39	21,42	695,41	1,35
40	584,67	8,14	275,25	13,80	727,66	7,99
41	822,02	16,37	440,79	13,35	655,20	4,46
42	600,87	5,45	437,47	12,21	662,17	15,94
43	810,28	24,52	336,35	10,68	465,15	8,36
44	----	----	625,77	10,95	561,72	11,53
45	----	----	712,74	22,55	677,51	47,07
46	----	----	----	----	698,20	14,50
47	----	----	----	----	645,28	17,62
48	----	----	----	----	461,39	5,47
49	361,65	3,11	359,11	3,68	457,47	20,28
50	402,69	19,76	359,13	9,44	494,69	2,37
51	574,22	9,08	351,53	18,14	597,24	6,45
52	518,74	7,51	491,07	2,40	429	8,13
53	497,29	3,10	490,51	1,30	530,09	2,39

---

---

54	762,19	20,58	659,34	4,82	462,77	4,83
55	1545,66	44,33	541,10	3,38	331,59	13,63
56	462,55	8,51	624,71	1,96	590,26	19,11
57	573,66	5,71	473,49	2,01	522,81	18,60
58	583,94	21,85	569,05	6,78	410,24	23,53
59	537,15	5,52	409,37	5,26	372,30	25,61
60	477	0,69	335,52	19,29	518,08	8,60
61	596,77	84,65	475,54	29,09	761,41	0,16
62	367,57	3,79	269	13,86	825,54	11,97
63	557,18	10,74	468,89	1,14	516,76	25,11
64	540,55	0,28	----	----	670	7,64
65	665,48	26,80	626,96	2,67	472,61	2,56
66	644,39	0,40	652,77	85,27	410,17	12,54
67	637,53	25,88	698,93	0,22	336,77	0,11
68	652,62	12,71	468,08	40,22	768,03	19,98
69	641,37	11,25	482,24	9,02	439,11	23,11
70	384,38	8,52	452,79	6,76	734,69	4,66
71	848,43	5,13	711,86	19,77	508,88	11,80
72	527,96	7,24	334,85	19,83	537,97	1,96
73	796,72	25,37	576,49	13,71	519,20	0,35
74	542,68	4,86	----	----	779,45	26,09
75	587,33	1,74	431,27	0,66	401,95	27,31

---