



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Carolina Dumke de Siqueira

Predição de intercorrências lactacionais: presença de bisfenol a no leite materno como
disruptor da lactogênese II

Florianópolis
2019

Carolina Dumke de Siqueira

**PREDIÇÃO DE INTERCORRÊNCIAS LACTACIONAIS: PRESENÇA DE
BISFENOL A NO LEITE MATERNO COMO DISRUPTOR DA LACTOGÊNESE II**

Dissertação submetida ao Programa de Pós
Graduação em Farmácia da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Fabíola Branco Filippin
Monteiro

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Siqueira, Carolina
PREDIÇÃO DE INTERCORRÊNCIAS LACTACIONAIS: PRESENÇA DE
BISFENOL A NO LEITE MATERNO COMO DISRUPTOR DA LACTOGÊNESE
II / Carolina Siqueira ; orientador, Fabíola Fillipin Monteiro, 2019.
79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Lactogênese II. 3. Bisfenol A. 4. Leite materno. 5. ELISA. I. Fillipin Monteiro, Fabíola . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

Carolina Dumke de Siqueira

Predição de intercorrências lactacionais: presença de bisfenol a no leite materno como disruptor da lactogênese II

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dr.(a) Simone Van de Sande Lee
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.(a) Adny Henrique Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Prof.(a) Dr.(a) Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa

Prof.(a) Dr.(a) Fabíola Branco Filippin Monteiro
Orientadora

Florianópolis, 2019.

Dedico este trabalho a todas as pessoas de luz que Deus me deu a oportunidade de encontrar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, que sempre me apoiou e mostrou tanto orgulho por tudo o que conquistei.

Minha irmã, minha *wonderwall*, que sempre cuidou mais de mim do que eu mesma e me protegeu de todas as formas possíveis.

Aos meus pais, que me permitiram voar e realizar todos os meus sonhos, sempre acreditando em mim e me incentivando. Obrigada por todas as oportunidades, vocês também são responsáveis por tudo isso.

Aos meus amigos e amigas de Brusque, que são parte do que eu sou hoje, estiveram comigo em todos os momentos, mesmo longe, sempre por perto.

Aos meus amigos e amigas de Florianópolis, vocês me fizeram ver que eu tinha uma família longe de casa. Vocês foram minhas mães e irmãos.

Aos amigos do laboratório, juntos todos os dias, me ajudando, apoiando e colocando fé em mim.

A minha orientadora, que fez eu acreditar que eu conseguiria o que quisesse e conseguiu fazer eu voltar a enxergar minhas qualidades. Sempre agradecendo e reconhecendo tudo o que eu fizesse, tornando todo esse processo mais leve.

Aos professores Ana e Marcos, que me ajudaram tanto com este trabalho sempre da melhor forma possível e com muita paciência.

Aos membros da banca, que aceitaram fazer parte de todo esse processo tão importante pra mim.

E a Deus, que permitiu com que todas essas pessoas estivessem na minha vida, vocês todos são insubstituíveis.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Farmácia pela oportunidade de aprendizado e engrandecimento pessoal.

E a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

We are infinite (Stephen Chbosky, 1999).

RESUMO

O leite materno exclusivo é o alimento recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) até os seis meses de idade, seguido de introdução aos alimentos pastosos com amamentação contínua. O processo de produção e secreção do leite é chamado de lactogênese e pode ser dividida em dois estágios: lactogênese I e II. A Lactogênese I se inicia durante a gestação e se caracteriza pelo desenvolvimento da mama. A Lactogênese II se inicia após o parto e é quando começa a secreção do leite. Atualmente têm se encontrado no leite materno uma substância que não faz parte da sua composição natural, o Bisfenol A (BPA). O BPA é um produto químico sintético utilizado como monômero em plásticos de policarbonato e resinas epóxi. A exposição a essa substância pode provocar inúmeros efeitos adversos à saúde, como diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares e a maior preocupação é com a exposição ao BPA por crianças e lactentes. Sendo assim, este trabalho objetivou determinar a concentração de BPA no colostro de mães atendidas no HU-UFSC através da técnica de ELISA e estabelecer associações entre o uso de plásticos e a lactogênese II. Para isso, foram coletadas amostras de leite materno (colostro) de 80 pacientes, que foram questionadas também a respeito de dados sociodemográficos e uso de plásticos. As amostras foram analisadas pelo método de ELISA e correlacionadas com os dados qualitativos das mães. Também foi realizado um acompanhamento via telefone para avaliar a amamentação. Além disso, uma revisão sistemática e metanálise foi feita. Das 64 pacientes em que foram analisadas as concentrações de BPA nas amostras de leite materno, todas elas apresentaram valores detectáveis pelo método de ELISA, resultando numa mediana de 34,18 ng/mL. Através do acompanhamento via telefone, 78% das mães continuaram com amamentação exclusiva. A mediana (34,18 ng/mL) de concentração deste estudo foi superior às medianas encontradas em outros artigos. Em conclusão, a exposição ao BPA não alterou o estado nutricional e nem a lactogênese II da mãe, no entanto, a concentração de BPA no leite materno é influenciada pelo consumo de alimentos em recipientes plásticos. Além disso, há uma heterogeneidade na frequência de detecção de BPA no leite materno entre as pesquisas realizadas em diferentes países e uma homogeneidade na frequência de detecção de BPA no leite materno entre os países Espanha, França e Japão. Houve alta concentração de BPA no leite materno das mães deste estudo em comparação com outros estudos, e as crianças deste trabalho estão mais expostas ao BPA através da ingestão do leite materno ultrapassando o limite máximo admissível.

Palavras-chave: leite materno, ELISA, bisfenol A, lactogênese II.

PREDICTION OF LACTATIONAL INTERCORRENCES: PRESENCE OF BISPHENOL A IN MOTHER'S MILK AS A DISRUPTOR OF LACTOGENESIS II

Exclusive breast milk is the recommended nutrition by the World Health Organization (WHO) until 6 months of age, followed by an introduction to foods with continuous breastfeeding. The process of milk production and secretion is called lactogenesis and can be divided into two stages: lactogenesis I and II. Lactogenesis I begins during gestation and is characterized by the development of the breast. Lactogenesis II begins after birth and is when milk secretion begins. Bisphenol A (BPA) is a synthetic chemical used as a monomer in polycarbonate plastics and epoxy resins. A substance that is not part of its natural composition, BPA, has been found in breast milk. Exposure to this substance can cause numerous adverse health effects, such as diabetes, obesity and cardiovascular disease, and the greatest concern is exposure to BPA by children and infants. Thus, this study aims to determine the concentration of bisphenol A in the colostrum of mothers treated at HU-UFSC through the ELISA technique and to establish associations between the use of plastics and lactogenesis II. For this, maternal milk samples (colostrum) were collected from 80 patients, who were also questioned about sociodemographic data and the use of plastics. The samples were analyzed by the ELISA method and correlated with the qualitative data of the mothers. A telephone follow-up was also carried out to evaluate breastfeeding. In addition, a systematic review and meta-analysis were done. Of the 64 patients in whom the concentrations of bisphenol A in the breast milk samples were analyzed, all of them presented detectable values, resulting in a median of 34,18ng/mL. Through telephone follow-up, 78% of the mothers continued with exclusive breastfeeding. The median (34,18 ng/mL) concentration of this study was higher than the medians found in other articles. In conclusion, the exposure to BPA did not alter the nutritional status nor the lactogenesis of the mother. However, BPA concentration of the mother is influenced by the consumption of food packaged in plastic containers. In addition, there is a heterogeneity in the frequency of detection of BPA in breast milk between the researchers conducted in different countries and homogeneity in the frequency of detection of BPA in breast milk between Spain, France, and Japan. There was a high concentration of BPA in the breast milk of the mothers of this study compared to other studies and the children in this study are more exposed to BPA through the ingestion of milk exceeding the maximum permissible limit.

Keywords: breast milk, ELISA, bisphenol A, lactogenesis II.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenvolvimento da mama.....	18
Figura 2 – Fisiologia da mama na lactação	19
Figura 3 – Organização intracelular da MEC.....	21
Figura 4 – Estrutura molecular do BPA.	27
Figura 5 – Metabolismo do BPA.....	29
Figura 6 – Desenho experimental.....	34
Figura 7 – Curva padrão (apenas para referência) do conjunto diagnóstico ELISA BPA	37
Figura 8 – Questionário sobre a utilização de plásticos na rotina.	42
Figura 9 – Concentrações de Bisfenol A no leite materno pelo método de ELISA.....	45
Figura 10 – Associação entre concentração de Bisfenol A e estado nutricional da participante	45
Figura 11 – Associação entre a concentração de bisfenol A e a amamentação.....	46
Figura 12 – Gráfico de floresta regressão logística	47
Figura 13 – Ingestão de BPA pelo RN até o primeiro mês.	48
Figura 14 – Ingestão de BPA pelo RN até o primeiro mês utilizando-se o percentil superior de consumo de leite	48
Figura 15 – Representação das concentrações de Bisfenol A no leite materno acima da concentração máxima admissível.	49
Figura 16 – Fluxograma de seleção de estudos.	50
Figura 17 – Gráfico de floresta.....	56
Figura 18 – Gráfico de funil.	57
Figura 19 – Curva padrão BPA.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escore de pontuação dos artigos.....	39
Tabela 2 – Dados clínicos das pacientes	41
Tabela 3 – Formas de aleitamento (N = 50).....	44
Tabela 4 – Compilação dos dados da literatura.....	50
Tabela 5 – Escore de pontuação dos artigos.....	54
Tabela 6 – Metanálise separada por países.....	57
Tabela 7 – Avaliação do estado nutricional da gestante segundo Índice de Massa Corporal (IMC) por semana gestacional.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC - Ácidos graxos de cadeia curta

ALARA - Tão baixo quanto razoavelmente possível

APCI/MS – Ionização química por pressão atmosférica acoplada ao espectrômetro de massas

BPA – Bisfenol A

BPF – Bisfenol F

CA – Canadá

CIAM – Central do incentivo ao aleitamento materno

CN – China

DNF – Dado não fornecido

ELF5 - Fator de transcrição nuclear

ELISA – Imunoensaio enzimático

EPA - *United States Environmental Protection Agency*

ER – Retículo endoplasmático

ES – Espanha

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and drug administration*

FR – França

GC-MS – Cromatografia gasosa

GC-MS/MS – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HMO – Oligossacarídeos do leite humano

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-FLD – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector fluorescente

HPLC-MS/MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas

HRGC – Cromatografia gasosa de alta resolução

HRMS - Espectrometria de massa de alta resolução

HTLV – Vírus linfotrópico da célula humana

HU – Hospital Universitário

IFN- γ – Interferon γ

IgS – Imunoglobulina S

IL-13 – Interleucina 13

IL-4 – Interleucina 4
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
IMC – Índice de massa corporal
JP – Japão
KR – Coréia
LC-MS – Cromatografia líquida
LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas
LC-QqQ-MS - Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa triplo quadrupolo
LD – Lipídio
MEC - Células epiteliais mamárias alveolares polarizadas
MFG - Glóbulo de gordura do leite
NOAEL - Nível sem efeito adverso observado
OMS – Organização Mundial da Saúde
PL – Polônia
RN – recém nascido
sIgA – Imunoglobulina A secretora
sIgG – Imunoglobulina G secretora
SLPI - Protease leucocitária secretora
SNC – Sistema nervoso central
SPE-UPLC-MS/MS - Extração em fase sólida e separação em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
SV – Vesícula secretora
TDI – Ingestão diária máxima admissível
TGF - Fator transformador de crescimento
Th2 – T helper 2
TNF- α – Fator de necrose tumoral α
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UGT - UDP-glucuronosiltransferase
UGT2B1 – Isoforma da UDP-glucuronosiltransferase
US – Estados Unidos
WAP – *Whey acidic protein*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 DESENVOLVIMENTO DA MAMA.....	18
2.2 FISIOLOGIA DA LACTAÇÃO	20
2.3 ADIPÓCITO ROSA.....	22
2.4 LACTOGÊNESE	23
2.5 OBESIDADE E LACTAÇÃO	23
2.6 COMPOSIÇÃO DO LEITE MATERNO	24
2.7 BISFENOL A	27
2.8 BISFENOL A E OBESIDADE	30
2.9 EXPOSIÇÃO AO BISFENOL A.....	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	34
4.2 PARTICIPANTES	34
4.2.1 Coleta de informações	35
4.2.2 Coleta das amostras.....	36
4.3 EXTRAÇÃO DE GORDURA DAS AMOSTRAS	36
4.4 DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A (BPA) POR ELISA	36
4.5 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DO RECÉM-NASCIDO (RN) AO BPA.....	37
4.5.1 Avaliação da concentração de BPA máxima admissível no leite materno	38
4.6 REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE	38
4.6.1 Busca de artigos	38

4.6.2 Seleção de estudos e coleta de dados	39
4.6.3 Avaliação da qualidade do artigo.....	39
4.6.4 Metanálise.....	40
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5 RESULTADOS	41
5.1 DADOS CLÍNICOS	41
5.1.1 Utilização de plásticos	41
5.1.2 Avaliação da amamentação	44
5.2 DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A (BPA) POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO	44
5.3 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DO RN.....	47
5.3.1 Avaliação da concentração de BPA máxima admissível no leite materno	49
5.4 REVISÃO SISTEMÁTICA	49
5.4.1 Avaliação da qualidade dos artigos.....	54
5.5 METANÁLISE.....	55
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE A – Curva de calibração.....	72
APÊNDICE B – Tabela de avaliação do estado nutricional.....	73
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.....	75
ANEXO B – QUESTIONÁRIO	78

1 INTRODUÇÃO

Durante a gestação, os alvéolos e ductos mamários começam a se desenvolver e durante o parto, ocorre uma diferenciação funcional, levando à secreção do leite. Com o desmame, ocorre uma involução dos lóbulos e alvéolos e assim a mama se remodela e volta a ter a mesma forma estrutural anterior à gestação. A cada nova gestação, ocorre novamente o desenvolvimento da mama para secreção do leite (MCNALLY; STEIN, 2016).

O leite materno exclusivo é o alimento recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) até os seis meses de idade, seguido de introdução aos alimentos pastosos com amamentação contínua (OMS, 2012). O processo de produção e secreção do leite é chamado de lactogênese e pode ser dividido em dois estágios: lactogênese I e II. A lactogênese I se inicia durante a gestação e se caracteriza pelo desenvolvimento da mama. A lactogênese II se inicia após o parto e é quando começa a secreção do leite (PREUSTING et al., 2017).

A lactogênese II é considerada tardia quando se inicia 72 h após o parto (MATIAS et al., 2014). Quando ocorre essa lactogênese tardia, os recém-nascidos apresentam perda de peso, o que leva a necessidade de complementação com fórmula, além do alto risco de interrupção precoce da amamentação (NOMMSEN-RIVERS, 2016). A obesidade materna é um dos fatores que pode estar relacionada com a lactogênese II tardia, além de idade materna aumentada, primiparidade, diabetes gestacional, parto cesárea e uso de analgésicos (TURCK SIN et al., 2014).

O leite materno pode ser classificado em colostro, leite de transição e leite maduro e a sua composição é adaptada para cada mãe atender as necessidades do bebê e pode ser afetada pela alimentação da mãe, hora do dia, estágio da lactação entre outros fatores (ZIVKOVIC; NORDING; OHMAN, 2016). O colostro é essencial para o desenvolvimento da criança, sendo rico em citocinas, peptídeos antimicrobianos, sais minerais, hormônios, anticorpos e fatores bioativos, sendo assim, além da função de nutrir o recém-nascido, ele também tem atividade imunomoduladora (DRAGO et al., 2016).

Atualmente, tem se encontrado no leite materno uma substância que não faz parte da sua composição natural, o Bisfenol A (BPA). O BPA é um produto químico sintético utilizado como monômero em plásticos de policarbonato e resinas epóxi. Pode ser encontrado no interior de latas de alumínio, mamadeiras de plástico, garrafas plásticas, materiais dentários, entre outros. No corpo humano, pode ser encontrado na forma livre ou conjugada, e seu metabolismo ocorre via hepática. Estudos demonstraram que o BPA possui atividade estrogênica e antiandrogênica, por isso é considerado um desregulador endócrino

(PERGIALIOTIS; KOTROGIANNI; CHRISTOPOULOS, 2017). Estudos em animais também demonstraram redução da qualidade espermática, perturbação do equilíbrio hormonal e danos nos órgãos reprodutivos (MCLACHLAN; MARTIN, 2006).

Além disso, estudos *in vitro* demonstraram aumento da diferenciação celular dos adipócitos, levando ao acúmulo de gordura em animais que foram expostos ao BPA, promovendo também o ganho de peso (MIYAWAKI et al., 2007). Estudos *in vivo* também relatam associações positivas entre a exposição ao BPA e obesidade (CAPOROSI; PAPALEO, 2015).

Trabalhos sugerem que a exposição a substâncias químicas ambientais, como o BPA, que agem regulando e promovendo inadequadamente o acúmulo de lipídios e a adipogênese, podem aumentar o risco de obesidade, principalmente quando a exposição ocorre durante a gestação e o início da vida (VAFEIADI et al., 2016). Além disso, a exposição ao BPA durante a gravidez pode resultar em doença pré-natal significativa, portanto, a exposição ocupacional deve ser evitada durante este período (PERGIALIOTIS; KOTROGIANNI; CHRISTOPOULOS-, 2017).

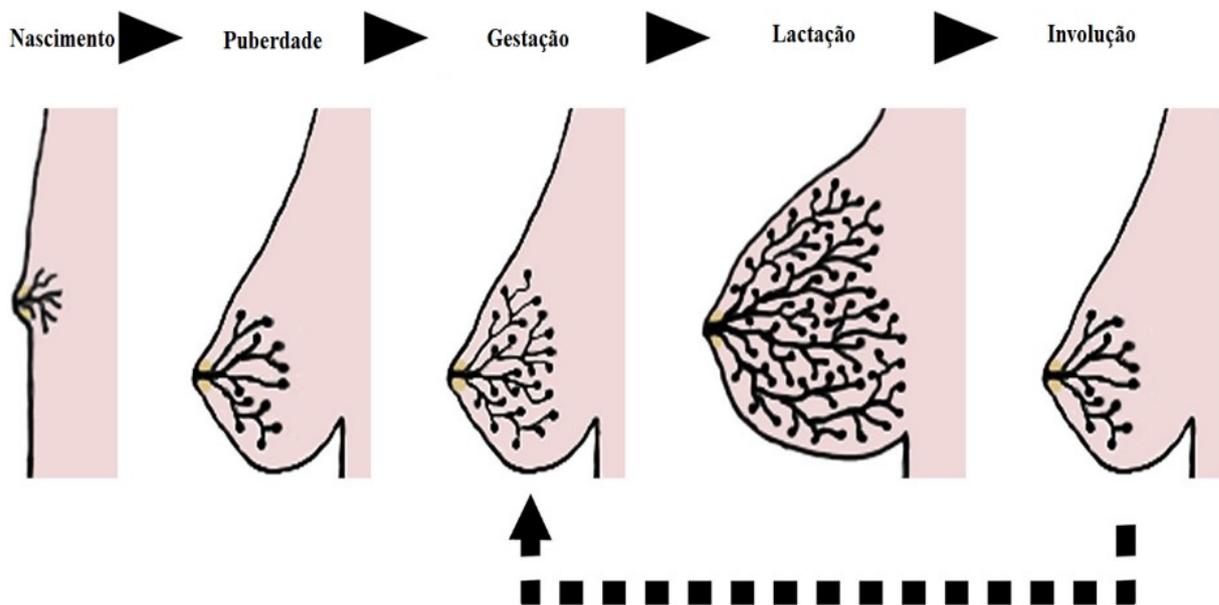
Devido a grande preocupação com o risco humano à exposição ao BPA, além de ser também prejudicial ao meio ambiente, foi criado um projeto de lei no Brasil (Projeto de Lei N° 5.483 de 2016) que dispõe sobre a proibição da utilização da substância BPA na fabricação e envasamento de alimentos, bebidas, medicamentos, utensílios, embalagens e recipientes (CAMARA DOS DEPUTADOS, 2016). Em 2011, o Ministério da Saúde publicou uma resolução (RDC N° 41, de 16 de setembro de 2011) que proíbe o uso do BPA em mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESENVOLVIMENTO DA MAMA

Após o nascimento, o tecido mamário feminino possui ductos limitados e na puberdade, com o aumento dos níveis hormonais, ocorre a proliferação de células epiteliais mamárias alveolares polarizadas (MEC - *mammary epithelial cell*) e ampliação do tecido adiposo circundante. No início da gravidez, os ductos se alongam e se ramificam e os alvéolos se desenvolvem e é durante a lactação que o epitélio mamário atinge seu máximo desenvolvimento, contendo numerosos alvéolos que produzem o leite. Com o desmame, a produção do leite cessa, os alvéolos regridem e o epitélio mamário retorna ao estado anterior (Figura 1) (TRUCHET; BIOLOGIST; HONVO-HOU, 2017).

Figura 1 – Desenvolvimento da mama



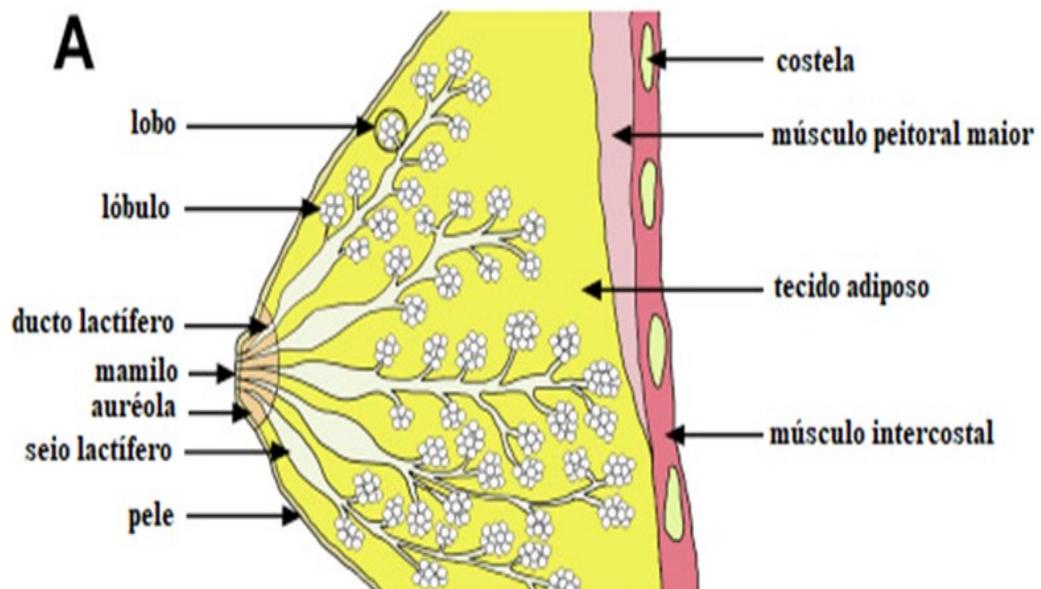
Fonte: Adaptado de TRUCHET, Sandrine, 2017.

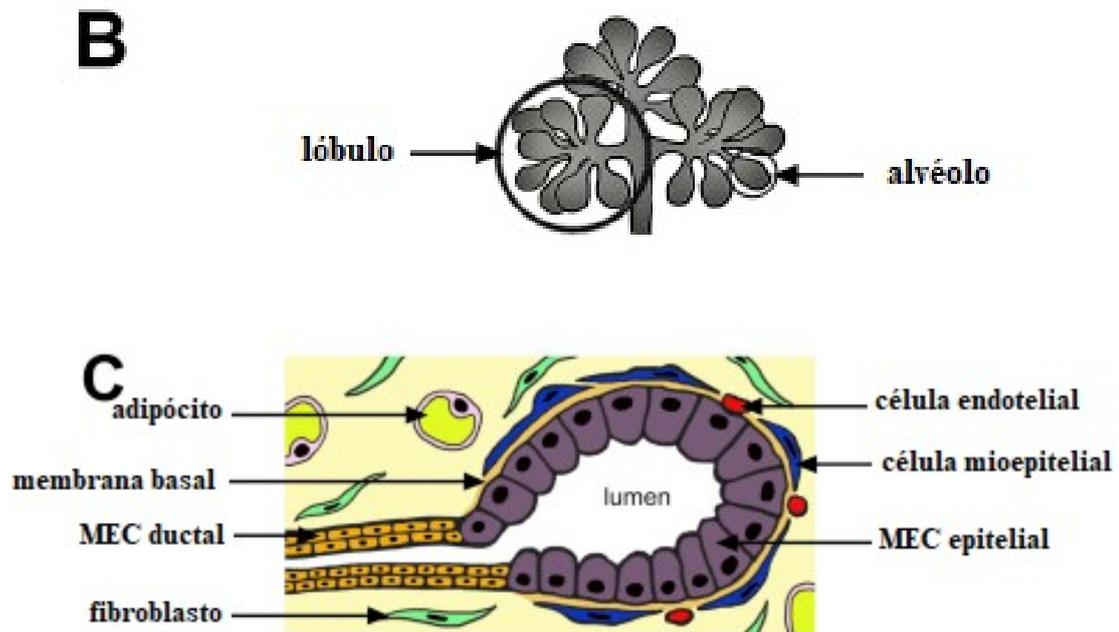
Durante a gravidez, devido a liberação de hormônios como a prolactina, estrogênio e progesterona, se inicia o desenvolvimento da mama, com conseqüente aumento do seu volume e densidade. Após o parto, as concentrações de estrogênio e progesterona diminuem, iniciando então o processo de lactação. A produção e secreção do leite materno se dá pelo aumento da prolactina, hormônio de crescimento e insulina. Outro hormônio importante neste processo é a ocitocina, que tem como função regular a secreção do leite, sendo liberada em

resposta aos reflexos neurais ativados pela sucção do recém-nascido. Com o desmame, os elementos glandulares, ductais e estromais atrofiam, resultando na diminuição da mama (PANDYA; MOORE, 2011).

Durante a lactação, o epitélio mamário se organiza em lobos, que contém numerosos lóbulos conectados a ductos lactíferos, que levam o leite até o mamilo. Estes ductos são formados por uma bicamada de MEC. Os lóbulos são formados por alvéolos, que são as unidades secretoras de leite. Estes alvéolos são formados por uma monocamada de MEC dispostas ao redor de um lúmen central, onde o leite é secretado, e são incorporados a um estroma contendo colágeno, células endoteliais, adipócitos e fibroblastos (Figura 2) (TRUCHET; BIOLOGIST; HONVO-HOU, 2017).

Figura 2 – Fisiologia da mama na lactação



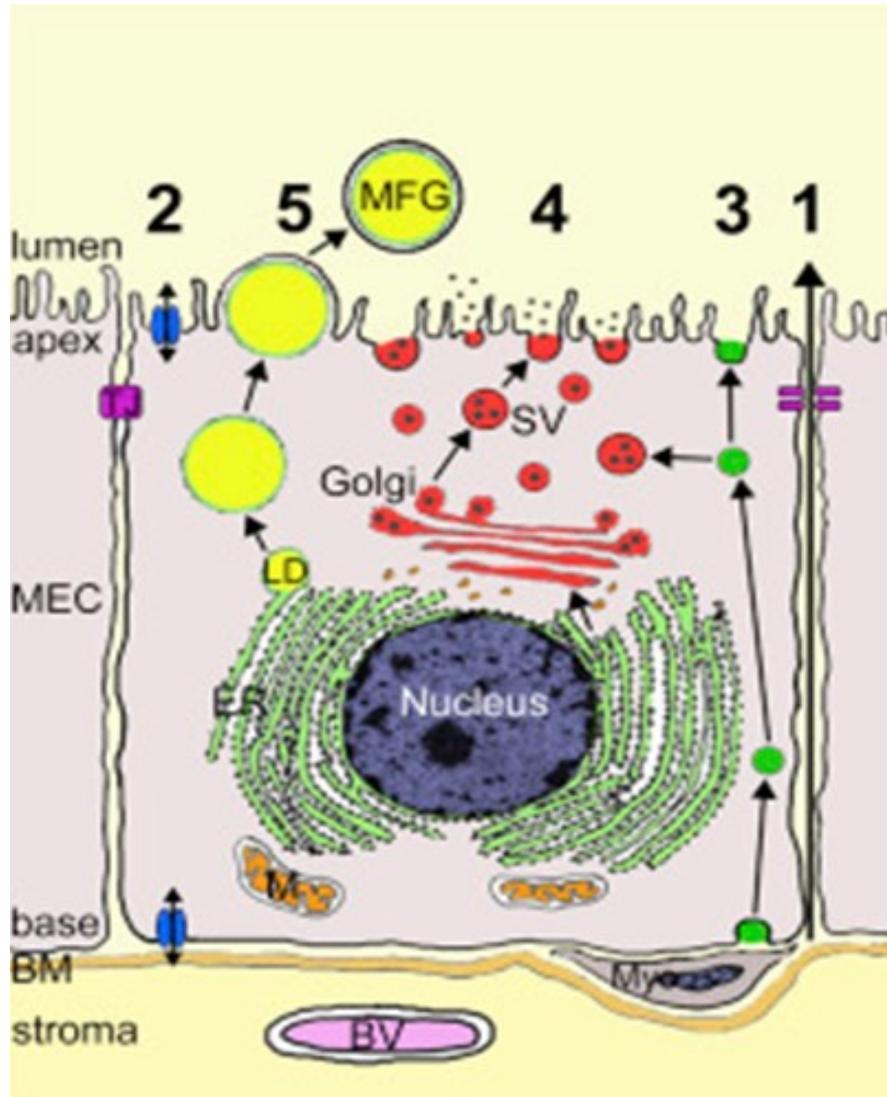


Fonte: Adaptado de TRUCHET, Sandrine, 2017.

2.2 FISILOGIA DA LACTAÇÃO

A membrana plasmática apical da MEC limita o lúmen dos alvéolos, onde o leite é liberado. Como sua principal função é produzir e secretar grandes quantidades de leite, a organização intracelular da MEC reflete seu estado secretor. O citoplasma da MEC alveolar é preenchido com uma extensa rede de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi aumentado e numerosas mitocôndrias e vesículas secretoras contendo vesículas de caseína. A lactose é sintetizada no aparelho de Golgi e transportada para as vesículas secretoras em direção a membrana plasmática apical. As MECs secretórias também produzem gotículas lipídicas emergentes do retículo endoplasmático pelo acúmulo de lipídios neutros e que crescem durante o transporte antes de serem liberados como glóbulos de gordura do leite por brotamento (Figura 3) (TRUCHET; BIOLOGIST; HONVO-HOU, 2017).

Figura 3 – Organização intracelular da MEC.



Os componentes do leite são secretados no lúmen do alvéolo por diferentes vias nas MECs. O transporte de componentes plasmáticos e às vezes de leucócitos ocorre através da via paracelular (1). Transportadores de membrana (2) permitem o movimento direto de íons, água e glicose através da membrana basal e apical da MEC. Algumas proteínas plasmáticas atingem o lúmen por transcitose vesicular (3). Proteínas do leite, lactose, cálcio e outros componentes da fase aquosa do leite são transportados por vesículas secretoras (SVs) e liberados após a exocitose (4). Os lipídios (LD) são formados no retículo endoplasmático (ER) e crescem durante o transporte para o ápice da MEC, onde são liberados como glóbulos de gordura do leite (MFG) por brotamento, sendo envolvidos pela membrana plasmática apical da MEC (5). Fonte: Adaptado de TRUCHET, Sandrine, 2017.

Durante a lactação, a glândula mamária consiste em um epitélio glandular túbulo-alveolar altamente ramificado, envolto por um estroma de tecido adiposo e conjuntivo e sustentado por uma estrutura frouxa de tecido conjuntivo fibroso (GEDDES, 2007). A mama possui cerca de 15-20 lóbulos com tamanhos variáveis, sendo que cada lóbulo contém entre

10 a 100 alvéolos. Os alvéolos agrupam-se em torno de ductos que vão em direção ao mamilo por um ducto lactífero, que se dilata durante e ejeção do leite (RAMSAY et al., 2004).

2.3 ADIPÓCITO ROSA

A glândula mamária funciona como uma glândula somente durante a gestação e a lactação, porque sua porção glandular, o alvéolo produtor de leite, se desenvolve apenas nesse momento e involui após o final da lactação (RICHERT et al., 2000). Em todos os outros períodos da vida, a mama consiste em gordura infiltrada por ductos ramificados que convergem em um mamilo. As células alveolares derivam dos progenitores luminais contidos nos ductos; no entanto, sua morfologia aponta para outra possível origem: a conversão direta dos adipócitos. A comparação de alvéolos recém-formados encontrados no início e no final da gravidez mostrou que a principal diferença morfológica reside na quantidade de lipídios que são armazenados em seu citoplasma. Todas as células epiteliais alveolares encontradas no final da gestação são imunorreativas para marcadores de diferenciação tardia - como a *whey acidic protein* (WAP) e o fator de transcrição nuclear ELF5, um regulador chave da alveologênese - e apresenta uma morfologia remanescente de adipócitos uniloculares (adipócitos brancos) (PROKESCH et al., 2014).

Esse tecido adiposo que recobre a glândula mamária durante a lactação é o tecido adiposo rosa. Durante a gravidez e lactação, os depósitos subcutâneos do tecido adiposo da mama se transformam em glândulas mamárias e estudos sugerem que os alvéolos se desenvolvem em duas etapas através de dois diferentes mecanismos: Na primeira fase da gravidez, os alvéolos são constituídos de células epiteliais com gotículas de lipídio citoplasmático ausentes que poderiam derivar da proliferação de células-tronco. Entretanto, no segundo estágio da gravidez, as células epiteliais estão repletas de lipídios enquanto a quantidade de gordura subcutânea reduz. Esses dados sugerem que na segunda parte da gravidez (dia 17 da gestação do rato), os adipócitos subcutâneos adquiram características epiteliais, provavelmente sob estímulos hormonais, agregando-se a adipócitos cor-de-rosa com comprometimento similar as células mioepiteliais para formar alvéolos secretores de leite derivados de tecido adiposo (GIORDANO et al., 2014).

2.4 LACTOGÊNESE

O processo de produção e secreção do leite é dividido em duas fases: lactogênese I e lactogênese II. A lactogênese I começa no início da gestação, onde ocorre a preparação do tecido mamário para a síntese do leite, através de mudanças físicas que incluem hipertrofia dos adipócitos, desenvolvimento dos ductos e lóbulos mamários, multiplicação e desenvolvimento dos alvéolos (JEVITT; HERNANDEZ; GROËR, 2007). Após o parto, a expulsão da placenta resulta em uma queda da progesterona e estrogênio, enquanto as concentrações de prolactina permanecem altas na presença de insulina e cortisol, resultando na lactogênese II, onde se inicia a secreção do leite. Esse leite secretado pode ser classificado em colostro (0 - 3 a 0 - 5 dias após o parto), leite de transição (até 15 dias após o parto) e leite maduro (após 15 dias do parto) e essa diferença de classificação refere-se à alteração do teor de componentes do leite durante a lactação (RASMUSSEN; KJOLHEDE, 2004).

2.5 OBESIDADE E LACTAÇÃO

O aleitamento materno pode ser particularmente difícil em determinadas situações. Há relatos na literatura sobre possíveis fatores associados à incapacidade de aleitamento, o retardo da lactogênese ou a simples desistência do ato de amamentar. Tem sido demonstrado que o índice de massa corporal (IMC) pré-gestacional está negativamente associado com o tempo de lactogênese II, o início da secreção do colostro (RASMUSSEN; KJOLHEDE, 2004). Lembrando que IMC é medido pela divisão do peso em quilogramas pela altura em metros ao quadrado ($\text{peso}/\text{altura}^2$), utilizando os critérios da OMS. Sendo que é considerado baixo peso IMC $<18,5$, peso normal IMC entre 18,5 e 24,9, sobrepeso IMC entre 25,0 e 29,9, obesidade classe I IMC entre 30,0 e 34,9, obesidade classe II IMC entre 35,0 e 39,9 e obesidade classe III IMC ≥ 40 (WHO, 2000).

Postula-se que a obesidade materna desempenhe um papel inibidor sobre a prolactina, retardando ou mesmo inibindo a produção e secreção do leite. A queda na concentração de progesterona que ocorre imediatamente após o parto dá início à secreção do colostro, mas a manutenção das concentrações de prolactina e cortisol são necessárias para que esse mecanismo seja eficaz. Sabe-se que o tecido adiposo produz e secreta altas concentrações de progesterona. Esta fonte adicional de progesterona pode levar a consistentemente maiores concentrações de progesterona entre mulheres obesas em comparação com mulheres de peso normal. Isto, por sua vez, levaria a um atraso na obtenção da concentração apropriada para

desencadear o início da lactogênese II (RASMUSSEN; KJOLHEDE, 2004). A obesidade materna foi definida como um importante fator de risco para o atraso na amamentação, devido a uma menor resposta da prolactina à sucção do bebê. Esse atraso pode levar a incapacidade de sustentar o aleitamento materno, com conseqüente interrupção da amamentação e diminuição do peso do recém-nascido (MA et al., 2012).

A obesidade é um problema obstétrico de extrema importância por poder afetar tanto a mãe, aumentando o risco de desenvolver diabetes gestacional e pré-eclâmpsia, quanto o feto, que será mais propenso a desenvolver síndrome metabólica na vida adulta, além de um risco aumentado de morbidade e mortalidade obstétrica (BONEY et al., 2005).

Em estudo anterior, os autores mostram que há uma maior concentração de 8-hidroxi-desoxiguanosina, que é um marcador de estresse oxidativo, no leite materno de mães obesas em comparação com mães saudáveis. Esse resultado sugere que, assim, poderá contribuir para um elevado ganho de peso, ou limitado crescimento linear, colocando o lactente em maior risco de obesidade ao longo da vida (YOUNG et al., 2018).

Mesmo a amamentação sendo dificultada pela obesidade, ela deve continuar sendo encorajada, não só pelos potenciais benefícios neonatais, mas também pelos maternos, relacionados à redução do peso no pós-parto e diminuição do risco de diabetes em mulheres obesas que desenvolveram diabetes gestacional (GUNDERSON et al., 2016).

2.6 COMPOSIÇÃO DO LEITE MATERNO

O leite materno é um fluido biológico essencial para nutrição e amadurecimento do sistema imunológico do recém-nascido (FUJITA et al., 2012) e recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a única fonte de nutrição pelos primeiros seis meses de vida. A sua composição é adaptada para cada mãe atender as necessidades do bebê e pode ser afetada pela alimentação da mãe, hora do dia, estágio da lactação entre outros fatores (ZIVKOVIC; NORDING; OHMAN, 2016). Portanto, acredita-se que a composição do leite de cada mãe seja diferente (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2011). Ainda, há diversos componentes antimicrobianos e imunomoduladores no leite materno que tem a função de compensar as deficiências do sistema imune do recém-nascido, além de dificultar a translocação de patógenos no sistema gastrointestinal (KOROTKOVA, 2002). Além disso, bebês que foram amamentados possuem uma microbiota intestinal mais estável do que bebês que foram alimentados com fórmulas, isso se deve a alterações na

mucosa intestinal devido às substâncias bioativas presentes no leite materno (BEZIRTZOGLOU; TSIOTSIAS; WELLING, 2011).

Os componentes bioativos que estão presentes no leite materno têm a capacidade de inibir a inflamação e aumentar a produção de interleucinas 1, 6, 8 e 10, fator transformador de crescimento (TGF), PAF-acetil-hidrolase, antioxidantes, inibidores da protease leucocitária secretora (SLPI) e defensina. Além disso, contém também fatores que podem mediar a diferenciação e crescimento de células B, como a molécula de adesão vascular 1 e a molécula de adesão intracelular (ANDREAS; KAMPMANN; LE-DOARE, 2015).

Dentre os constituintes do leite materno, os lipídios são a maior fonte de energia. A grande maioria (98%) são triacilgliceróis e o restante consiste em diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios e colesterol (LOPEZ; MÉNARD, 2011). Como uma importante fonte de energia (DONOHOE et al., 2011), encontramos também os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), além de terem um papel no desenvolvimento saudável do trato gastrointestinal infantil (MONOLAYERS et al., 2009). As esfingomielinas, que estão presentes na membrana das células de gordura do leite, são importantes no processo de mielinização do sistema nervoso central (SNC) e tem demonstrado melhorar o desenvolvimento neurocomportamental de bebês com baixo peso ao nascer (TANAKA et al., 2013).

Com a função de proporcionar nutrição, estimular a absorção de nutrientes e a atividade antimicrobiana e imunomoduladora, aproximadamente 400 formas diferentes de proteínas são encontradas no leite materno (MOLINARI et al., 2012). Essas proteínas podem ser divididas em três grupos: caseínas, proteínas do soro e mucina. As proteínas do soro e as caseínas são classificadas de acordo com a sua solubilidade, sendo que as proteínas do soro estão solúveis na solução e as caseínas se encontram em forma de micelas, suspensas na solução. As proteínas mais presentes na fração do soro são a α -lactalbumina, lactoferrina, IgS, albumina sérica e lisozima. Há três tipos diferentes de caseínas presentes no leite materno humano: α , β e κ -caseína. A κ -caseína estabiliza as α e β -caseínas insolúveis, formando uma suspensão coloidal. No leite materno humano, o teor de proteína consiste em 13% de caseína, encontrando-se em uma concentração menor de caseína comparando com as outras espécies, consequentemente, a taxa de crescimento de bebês humanos é mais lenta (ANDREAS; KAMPMANN; LE-DOARE, 2015).

Outros constituintes do leite materno incluem uréia, creatinina, nucleotídeos, aminoácidos livres e peptídeos. Os nucleotídeos, por exemplo, são considerados nutrientes essenciais durante o início da vida, desempenhando papéis importantes em vários processos

celulares, como alterar atividades enzimáticas e atuar como mediadores metabólicos. Além disso, também auxiliam o desenvolvimento, maturação e reparo do trato gastrointestinal, assim como o desenvolvimento da microbiota e do sistema imune (MORA-MAGAN et al., 2007).

Quanto a presença de imunoglobulinas no leite materno, no início da lactação há a predominância da IgA secretora (sIgA), seguida da IgG secretora (sIgG) (HURLEY; THEIL, 2011). Os anticorpos presentes no leite materno são responsáveis pela proteção contra patógenos invasivos na superfície da mucosa, uma vez que as secreções do recém-nascido contêm apenas traços de sIgA e sIgG (BRANDTZAEG, 2009). A concentração de imunoglobulinas no leite materno diminui à medida que o sistema imune do recém-nascido se torna mais funcional, isso se dá pelo fato de que a permeabilidade intestinal do bebê diminui com o tempo, sendo assim ele se torna incapaz de absorver essas macromoléculas. O leite materno contém também IgA específicos contra o *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *Giardia lamblia*, e infecções do trato respiratório (EDMOND; ZAIDI, 2010).

As citocinas TNF- α , IL-6, IL-8 e IFN- γ também são encontradas no leite materno, geralmente em concentrações mais baixas que diminuem ao longo da lactação (DEUGARTE et al., 2005). Tanto IL-8 quanto TNF- α apresentaram-se aumentadas no leite maduro de mães que tiveram pré-eclâmpsia (AKSOY; TARAKC, 2005). O papel das citocinas pró-inflamatórias encontradas no leite materno ainda está em estudo, mas são conhecidas por estarem envolvidas no recrutamento de neutrófilos, melhorar o sistema intestinal e a IL-8 pode ajudar a proteger o recém-nascido contra os danos mediados por TNF- α (MAHESHWARI et al., 2004). Concentrações mais elevadas de IL-6 e IL-8 ocorrem na mastite (infecção do tecido mamário), com maiores concentrações das citocinas confinadas nos lóbulos afetados (MIZUNO et al., 2012). A citocina IFN- γ também tem sido amplamente estudada devido ao seu papel pró-inflamatório, aumentando a resposta inflamatória, enquanto suprime a resposta alérgica (AGARWAL et al., 2011). O colostro de mães alérgicas contém concentrações de IFN- γ mais baixos, mas concentrações superiores de citocinas de resposta Th2 como, IL-4 e IL-13 em comparação com as mães não-alérgicas (NOVOTNÁ; KOCOURKOVÁ, 2012).

Além disso, uma grande variedade de carboidratos diferentes e complexos está presente no leite, sendo o mais abundante o dissacarídeo constituído de glicose covalentemente ligada à galactose. A lactose está presente em maior concentração no leite humano em comparação a outras espécies, devido às altas exigências energéticas do cérebro. Os oligossacarídeos do leite humano (HMO - *Human Milk Oligosaccharides*) também

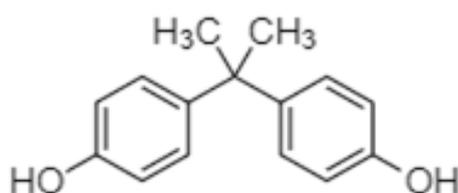
compõem uma fração significativa de carboidratos, porém, por não ser digerível pela criança, tem como função nutrir a microbiota gastrointestinal. Eles são um importante componente de carboidratos e o terceiro maior componente no leite materno, totalizando, em média, de 12,9 g/L no leite maduro e 20,9 g/L quatro dias após o parto, no colostro (ANDREAS; KAMPMANN; LE-DOARE, 2015).

Os HMO são compostos por cinco diferentes açúcares, L-fucose, D-glicose, D-galactose, N-acetilglicosamina e N-ácido acetilneuramínico. Eles atuam como pré-bióticos, proporcionando o crescimento de cepas de bactérias benéficas ao trato gastrointestinal infantil, como a *Bifidobacterium infantis*, protegendo a criança da colonização por bactérias patogênicas (WARD et al., 2006). Os HMO também desempenham papel importante na prevenção de infecções do trato respiratório (NEWBURG; WALKER, 2007).

2.7 BISFENOL A

O bisfenol A ou BPA (4,4'-isopropilidenedifenol ou 2,2-bis (4-hidroxifenil) -propano) é um composto branco cristalino com um peso molecular de 228,29 g/mol, seu ponto de fusão é 156 °C e apresenta baixa solubilidade em água (Figura 4) (LEGEAY, 2017).

Figura 4 – Estrutura molecular do BPA.



Fonte: Chemdraw.

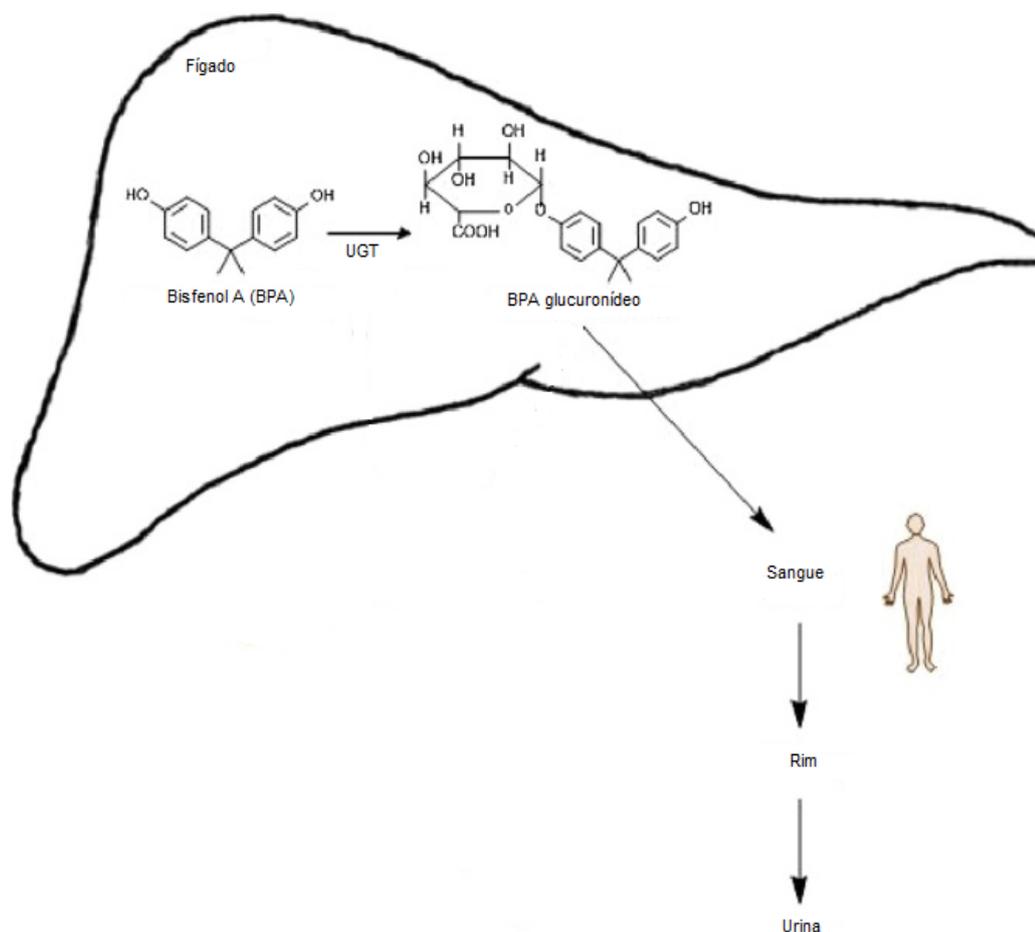
O BPA tem sido amplamente utilizado como monômero na produção de plástico policarbonato e resina epóxi em embalagens de alimento, selantes dentários e tubulações (HUANG et al., 2012).

O BPA é um desregulador endócrino conhecido e foram descritas atividades estrogênicas, antiandrogênicas, em glicocorticoides e hormônios da tireóide (SKLEDAR; MA, 2016). Estudos mostram que existe uma alta exposição humana ao BPA devido à alta ocorrência do analito em amostras biológicas, principalmente em amostras de urina (AZZOUZ; RASCÓN; BALLESTEROS, 2016). A exposição a essa substância pode provocar

inúmeros efeitos adversos à saúde, como diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares (ROCHESTER, 2013). Foi demonstrado que concentrações mais elevadas de BPA urinário durante a gestação aumentaram a possibilidade de crianças com pesos mais baixos ao nascer (HUO et al., 2015). Isso se deve ao fato de que o BPA pode atravessar a placenta humana e apresentar um risco ao desenvolvimento fetal (CORBEL et al., 2014). O BPA também pode reduzir a secreção basal de testosterona, podendo diminuir a fertilidade em homens (ELADAK et al., 2015).

O BPA pode ser metabolizado por mamíferos através de duas vias: glucuronidação e sulfatação. O metabolismo por glucuronidação ocorre pela via hepática e essa reação é catalisada pela enzima UGT2B1, uma isoforma da UGT (UDP-glucuronosiltransferase). A taxa de glucuronidação hepática é menor durante a gravidez devido a uma menor expressão da UGT durante a gestação. A concentração de UGT no fígado fetal humano também é reduzida quando comparado ao fígado humano adulto. Uma vez metabolizado por glucuronidação, o BPA glucuronídeo é excretado através do trato urinário (Figura 5). Esta é outra contraindicação da exposição neonatal ao BPA e também justifica porque a concentração de BPA na placenta é maior do que no plasma da mãe (STRASSBURG et al., 2002).

Figura 5 – Metabolismo do BPA.



Fonte: Adaptado de JALAL, Nasir et. Al., Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic, 2018.

A outra reação de metabolismo do BPA é via citocromo p450s, metabolizando o BPA em bisfenol-o-quinona via 5-hidroxi-BPA e um intermediário semifenona bisfenol. Acredita-se que a sulfatação do BPA pelas sulfotransferases também seja parte das vias metabólicas de detoxificação (SHIMIZU et al., 2002).

O período de desenvolvimento que incluem o pré-natal, nascimento e infância são os momentos de maior sensibilidade aos efeitos do BPA e por ele ser classificado como um desregulador endócrino pode levar a alterações endócrinas e distúrbios metabólicos, por isso foi necessário que se tomassem medidas preventivas em vários países do mundo (BRAUN, 2017).

Em 2010, a França proibiu o uso do BPA para fabricação de mamadeiras de plástico como medidas de precaução após evidências sugerirem uma associação entre a exposição ao BPA e efeitos nocivos à saúde humana, principalmente em crianças. Posteriormente, em

2011, essa proibição foi aplicada em toda a Europa e em 2015, o continente proibiu o uso do produto em todos os materiais de contato com alimentos, definindo como ingestão diária máxima admissível (TDI - *Tolerable Daily Intake*) 4µg/kg/dia (EFSA, 2015).

Em 2012, a *Food and Drug Administration* (FDA), nos EUA, proibiu a presença de BPA em produtos destinados a lactentes e crianças. Através de um projeto realizado em 2014 no mesmo país, foi considerado “nível sem efeito adverso observado” (NOAEL - *Observed Adverse Effect Level*) de consumo de BPA de 5mg/kg/dia (FDA, 2019). Entretanto, após um estudo realizado no Canadá, avaliando o risco do BPA à saúde, o Ministro da Saúde do Canadá recomendou que o princípio geral de ALARA - *As Low As Reasonably Achievable* (tão baixo quanto razoavelmente possível) deveria ser aplicado para limitar a exposição ao BPA (HEALTH CANADA, 2013).

No Brasil, a Resolução RDC N° 41, de 16 de setembro de 2011 dispõe sobre a proibição de uso de Bisfenol A em mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes e dá outras providências: “Fica proibida a fabricação e importação de mamadeiras para a alimentação de lactentes que contenham a substância bisfenol A [2,2-bis(4-hidroxifenil) propano, CAS 000080-05-7] na sua composição.” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

2.8 BISFENOL A E OBESIDADE

Alguns estudos mostraram também associação da ingestão de BPA com a obesidade. O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino, sendo assim, o BPA como um desregulador endócrino poderia afetar este tecido (ZHAO et al., 2012). Demonstrou-se associação entre as concentrações circulantes altas de leptina com a maior exposição ao BPA, sendo a leptina uma adipocina associada à saciedade e regulação do balanço energético a resistência à mesma pode ocorrer através de vários mecanismos, incluindo o transporte defeituoso da leptina através da barreira hematoencefálica (BHE), atenuação da sinalização da leptina, inflamação e biodisponibilidade excessiva de zinco, contribuindo para o aumento do tecido adiposo (PAN; GUO; SU, 2014). Sugere-se que a exposição do BPA esteja associada com alterações nas concentrações de adipocinas envolvidas na regulação do apetite e saciedade e conseqüentemente com a fisiopatologia da obesidade, demonstrando que o tecido adiposo pode ser um alvo do BPA e produzindo disfunção dos adipócitos (SKLEDAR; MA, 2016).

2.9 EXPOSIÇÃO AO BISFENOL A

A principal fonte de exposição ao BPA em humanos é através da dieta, pela ingestão de alimentos e bebidas contaminadas, embora o ar, a poeira e a água sejam outras possíveis fontes de exposição. O BPA pode penetrar nos alimentos a partir dos revestimentos internos de resina epóxi dos alimentos enlatados e dos produtos de consumo, como utensílios de mesa em policarbonato, recipientes de armazenamento de alimentos, garrafas de água e mamadeiras. O grau em que o BPA passa dos frascos de policarbonato para o líquido ou alimento depende da temperatura do mesmo e do recipiente, quanto maior a mudança de temperatura, maior a liberação de BPA (NIH, 2019).

A utilização de produtos e consequente ingestão do BPA gera uma preocupação porque a exposição humana ao BPA é generalizada. A Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição realizada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças encontrou níveis detectáveis de BPA em 93% das 2517 amostras de urina de pessoas com seis anos ou mais. Outro motivo de preocupação é o fato de alguns estudos em animais relatarem efeitos em fetos e recém-nascidos expostos ao BPA (NIH, 2019).

Segundo relatório de especialistas realizado pela Food Agriculture Organization (FAO) e World Health Organization (WHO), estima-se que a exposição média de bebês exclusivamente amamentados (0 a 6 meses) ao BPA seja de 0,3 µg/kg de peso corporal por dia. Estimativas de exposição são geralmente maiores para bebês alimentados com fórmula em frascos contendo policarbonato em comparação com frascos sem policarbonato. A maior exposição ocorre em crianças de 0 a 6 meses de idade que são alimentadas com fórmula, sofrendo uma ingestão de 2,4 µg/kg de peso corporal por dia de BPA. Uma vez introduzidos alimentos sólidos (aos 6 – 36 meses), a exposição ao BPA diminui proporcionalmente com o aumento do peso corporal. Para crianças com mais de 3 anos, as estimativas mais elevadas de exposição não excederam 0,7 µg/kg por dia. Para adultos, as maiores estimativas não excederam 1,4 µg/kg de peso corporal por dia (FAO, 2010).

Alguns estudos mostram que esta alta exposição pode gerar consequências negativas ao ser humano, porém, devido à pequena quantidade de pesquisas, ainda há muitas dúvidas a respeito do seu potencial carcinogênico, neurotóxico, imunotoxicidade, efeitos cardiovasculares e desordens metabólicas (FAO, 2010).

A falta de informações sobre as consequências do uso do BPA torna necessária a realização de pesquisas a respeito desta substância para se descobrir sobre o mecanismo dos

malefícios gerados pelo mesmo, além de ser necessário possuímos informações adicionais sobre o que o BPA pode causar no corpo humano e meio ambiente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a concentração de bisfenol A (BPA) no colostro de mães atendidas no HU-UFSC através da técnica de Imunoensaio enzimático (ELISA) e estabelecer associações entre o uso de plásticos e a lactogênese II.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

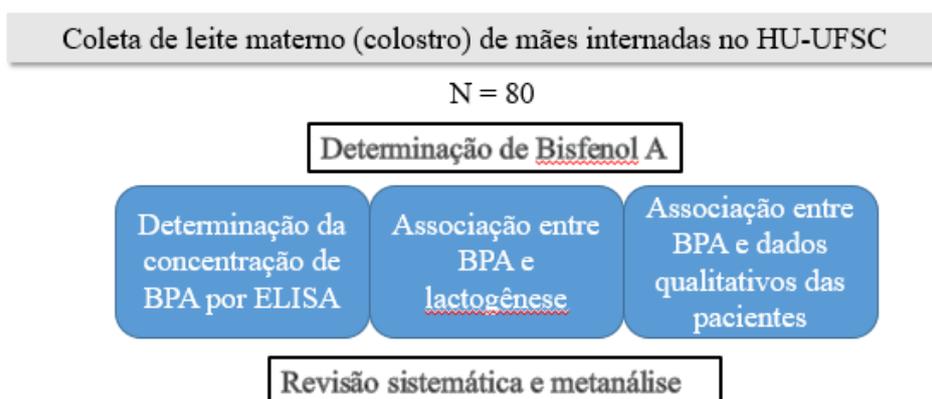
- Determinar as concentrações de BPA no leite materno (colostro) em até 72 h após o parto através da técnica de ELISA;
- Comparar os resultados do BPA com o uso de plásticos;
- Correlacionar os resultados do BPA com dados clínicos da mãe e do recém-nascido (RN);
- Realizar acompanhamento da amamentação para poder avaliar o BPA como um possível disruptor da lactogênese II;
- Avaliar a exposição ao BPA do RN a partir das concentrações no leite materno;
- Realizar uma revisão da sistemática e metanálise dos artigos encontrados sobre o tema proposto.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

A Figura 6 apresenta um esquema do desenho experimental deste trabalho.

Figura 6 – Desenho experimental.



Legenda: BPA – Bisfenol A

4.2 PARTICIPANTES

O estudo foi aprovado pelo Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU - UFSC) e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (CAAE 68008317.4.0000.0121) (ANEXO A). As participantes foram recrutadas em até 72 h após o parto. Para participar, as pacientes aceitaram todos os procedimentos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram excluídas do estudo mães vivendo com o vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana) 1-2 e HTLV (vírus linfotrófico da célula humana) ou que apresentavam qualquer outro impedimento clínico descrito pela equipe médica para amamentação. A avaliação do estado nutricional da gestante foi realizado conforme a idade gestacional, utilizando a tabela desenvolvida por Atalah e colaboradores em 1997 (APÊNDICE B).

4.2.1 Coleta de informações

As mães foram questionadas sobre informações pré e pós-gestacionais, socioculturais, socioeconômicos e uso de plásticos, em ambiente adequado e respeitando a adaptação com o RN. Os dados clínicos como Capurro (método para avaliação da idade gestacional do RN), tipo de parto, peso do RN ao nascer, duração do trabalho de parto (foi considerado início do trabalho de parto quando as contrações se tornaram frequentes e regulares), foram retirados dos prontuários das pacientes. As perguntas utilizadas para avaliar a utilização dos plásticos foram:

1. Você tem o costume de acondicionar comida/líquidos quentes em recipientes plásticos?
2. Você tem o costume de esquentar comida/bebida em recipiente de plástico no micro-ondas?
3. Qual a frequência que você ingere líquidos quentes, como café e chá, em recipientes plásticos?
4. Qual a frequência com que você ingere comida/bebida enlatada?

Após o nascimento, as participantes foram acompanhadas mensalmente por até seis meses e foram orientadas a comparecer às visitas mensais ao pediatra de escolha (rede privada ou Unidade Básica de Saúde) e receber informações sobre a importância da amamentação. Informações sobre o crescimento da criança ou possíveis complicações também foram coletadas. O estado de amamentação foi definido da seguinte forma:

- Amamentação exclusiva;
- Aleitamento misto (fórmula e leite materno);
- Uso somente de fórmula.

4.2.1.1 Informações coletadas

Em questionário (ANEXO B) previamente montado pela equipe do projeto, foram coletadas as seguintes informações (autodeclarações):

- Peso pré-gestacional;
- Peso atual;
- Altura;
- Raça;
- Aspectos socioeconômicos;

- Tipo de parto;
- Número de filhos;
- Amamentações anteriores (se houver);
- Peso do RN;
- Complicações na gravidez;
- Hábitos alimentares;
- Uso de plásticos no dia-a-dia.

4.2.2 Coleta das amostras

Para a coleta do leite materno (colostró), aproximadamente 2 mL de amostra foi solicitado através de ordenha manual, procedimento usual recomendado e facilitado pelos profissionais do CIAM (Central do Incentivo ao Aleitamento Materno). As amostras foram coletadas em copos coletores livres de BPA, posteriormente transferidas para eppendorfs também livres de BPA e armazenadas a -80 °C até o momento da análise.

4.3 EXTRAÇÃO DE GORDURA DAS AMOSTRAS

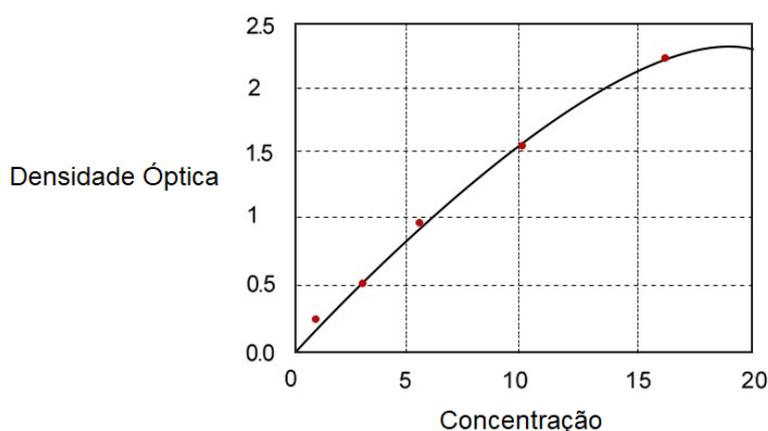
Previamente à análise de BPA por ELISA, 64 amostras de leite materno foram centrifugadas a 10.000 g por 30 minutos a 4 °C para extração de gordura das amostras e a camada intermediária de líquido foi coletada.

4.4 DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A (BPA) POR ELISA

As concentrações de BPA das pacientes foram analisadas nas amostras de leite materno através de um conjunto diagnóstico de imunoenensaio enzimático (ELISA) do tipo sanduíche, fabricado por MyBioSource (San Diego, Califórnia, EUA). A análise foi realizada de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. A solução padrão para ELISA (240 ng/mL) foi reconstituída com diluente padrão para gerar uma solução estoque padrão de 120 ng/mL e mantido em agitação leve por 15 minutos. A curva de calibração (Figura 7) foi feita em duplicata diluindo serialmente a solução estoque padrão 1:2 com diluente padrão para produzir soluções de 60 ng/mL, 30 ng/mL, 15 ng/mL e 7,5 ng/mL. O diluente padrão foi utilizado como branco. Para o ensaio, primeiramente foram adicionados 50 µL de cada ponto da curva em duplicata em seus respectivos poços, assim como o branco. Posteriormente,

foram adicionados 40 μL de cada amostra de leite materno e 10 μL do anticorpo anti-BPA. Ao fim, adicionou-se 50 μL de estreptavidina-HRP em todos os poços, a placa foi coberta e incubada por 60 minutos a 37 °C. Após a incubação, a placa foi lavada cinco vezes utilizando o tampão de lavagem. Adicionou-se 50 μL do substrato A e 50 μL do substrato B em todos os poços e incubou-se novamente por 10 minutos a 37 °C no escuro. Por fim, foram adicionados 50 μL da solução de parada em cada poço e a coloração azul se converteu em amarelo imediatamente. A absorbância foi medida através de espectrofotômetro, fabricado por Pharmacia LKB (Derwood, Maryland, EUA), em um comprimento de onda de 450 nm. As concentrações foram determinadas por interpolação em uma curva de calibração e a sensibilidade do ensaio foi de 0,23 ng/mL.

Figura 7 – Curva padrão (apenas para referência) do conjunto diagnóstico ELISA BPA



Fonte: Adaptado de MyBioSource, 2019.

4.5 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DO RECÉM-NASCIDO (RN) AO BPA

A fim de se obter uma estimativa da exposição ao BPA de crianças amamentadas, foram combinadas informações sobre o consumo de leite e das concentrações de BPA total no leite materno das pacientes do estudo. A exposição ao BPA dos RNs amamentados foi estimada seguindo a abordagem determinística. Nesta abordagem, o consumo diário estimado foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Consumo diário estimado} = C \times M$$

onde C é a concentração de BPA das pacientes e M é a taxa média de consumo de leite (quantidade de leite humano consumido por dia) (DUALDE et al., 2019).

Foi utilizada uma ingestão de leite materno de 150 mL/kg de peso corporal do RN por dia. Também foi calculada a exposição ao BPA utilizando o percentil superior (O percentil superior é relatado como média mais 2 desvios padrão) da ingestão de leite materno recomendada pela EPA (United States Environmental Protection Agency) para crianças do nascimento até menos de um mês de idade (220 mL/kg de peso corporal do RN por dia) (EPA, 2005).

4.5.1 Avaliação da concentração de BPA máxima admissível no leite materno

Calculou-se também, utilizando a mesma fórmula, qual seria a concentração máxima admissível de BPA no leite materno, para que a ingestão do RN não ultrapassasse o TDI (ingestão diária máxima admissível) de 4 µg/kg/dia estabelecido pelo EFSA (European Food Safety Authority) (EFSA, 2015).

$$C = TDI/M$$

Onde C é a concentração máxima admissível no leite materno, o TDI equivale a 4 µg/kg/dia e M é a taxa média de consumo de leite por dia.

Para isso, utilizou-se o peso médio de crianças nascidas com 40 semanas de gestação no Brasil (3,2 kg para meninas e 3,3kg para meninos) (PEDREIRA; PINTO, 2005) e a quantidade média de leite ingerido por crianças em até um mês de idade (150 mL/kg-dia) (EPA, 2005).

4.6 REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE

Foi realizada uma revisão sistemática e metanálise a partir dos artigos de ensaios clínicos encontrados sobre a concentração de BPA no leite materno humano.

4.6.1 Busca de artigos

A busca de estudos foi realizada nas bases de dados Pubmed e Web of Science em fevereiro de 2019. A estratégia de busca foi composta pelas seguintes chaves de pesquisa: "bisphenol A"[All Fields] AND "breast milk"[All Fields] AND ("2009/02/27"[PDat]:

"2019/02/24"[PDat] AND "humans"[MeSH Terms]) na base de dados Pubmed e TÓPICO: (bisphenol A) AND TÓPICO: (breast milk) AND TÓPICO: (human) Tempo estipulado: 2009-2019. Índices: SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, ESCI na base de dados Web of Science.

4.6.2 Seleção de estudos e coleta de dados

A seleção de estudos foi feita por análise dos títulos e resumos dos estudos selecionados pela busca. Foram inicialmente selecionados artigos que preenchessem os seguintes critérios: ensaios clínicos contendo a determinação de BPA no leite materno humano entre os anos de 2009 e 2019, em inglês.

4.6.3 Avaliação da qualidade do artigo

Para esta avaliação, foi utilizado o sistema de pontuação apresentado por Loney e colaboradores (1998). O escore de pontuação vai de 0 a 8, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Escore de pontuação dos artigos.

Item	Escore
1. Amostra aleatória ou população inteira	1 ponto
2. Amostragem imparcial	1 ponto
3. Tamanho amostral adequado	1 ponto
4. Medidas foram o padrão	1 ponto
5. Resultados medidos por avaliadores imparciais	1 ponto
6. Taxa de resposta adequada	1 ponto
7. Intervalo de confiança	1 ponto
8. Assuntos do estudo descritos	1 ponto
Escore máximo	8 pontos

Fonte: Loney, et al., 1998.

4.6.4 Metanálise

Para verificar a frequência de detecção do BPA no leite materno foi realizada a metanálise. A análise da frequência foi realizada pelo modelo de efeitos aleatórios. Os resultados foram expressos por meio de gráfico de funil e gráfico de floresta com intervalo de confiança de 95% (IC95%).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em mediana. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* MedCalc v19.0.4 (MedCalc, Ostend, Belgium). As diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando os testes Mann Whitney U para variáveis numéricas, e Qui-quadrado para análises de associação de duas variáveis qualitativas. Para a regressão logística, as seguintes variáveis foram testadas no modelo: Capurro, participantes que comiam comida enlatada, esquentavam o alimento no micro-ondas, bebiam líquidos quentes em recipientes plásticos, acondicionavam alimento em plástico, tipo de parto, peso do RN ao nascer, raça, ganho de peso na gestação e duração do trabalho de parto. As razões de chance foram calculadas (RC), bem como os seus intervalos de confiança 95% (IC95%). Para a análise de heterogeneidade dos artigos, realizou-se o teste estatístico Q de Cochran. A partir do resultado do teste Q foi feita a avaliação da inconsistência (I^2). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o $P \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS CLÍNICOS

De janeiro a abril de 2019, 80 pacientes internadas no Alojamento Conjunto do HU-UFSC foram incluídas no estudo e após a aplicação de questionário e avaliação de prontuário, obtiveram-se os dados clínicos das mulheres, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Dados clínicos das pacientes

Dados clínicos	Pré-gestacional	Pós-gestacional
N		80
Idade (anos)		27 (16 – 42)
Cor (%)		Branca: 65 Negra: 33 Indígena: 2
IMC (kg/m ²)	24,2 (17,4 – 41,3)	28,6 (23,0 – 43,8)
Ganho de peso (kg)		13,5 (0 – 31)
Tipo de parto (%)		Normal: 64 Cesárea: 36
Peso do RN (kg)		3,18 (2,16 – 4,64)
Idade gestacional (semanas)		39 (33 – 43)

Resultados expressos em mediana (valor mínimo e máximos) ou em frequência relativa. Fonte: a autora.

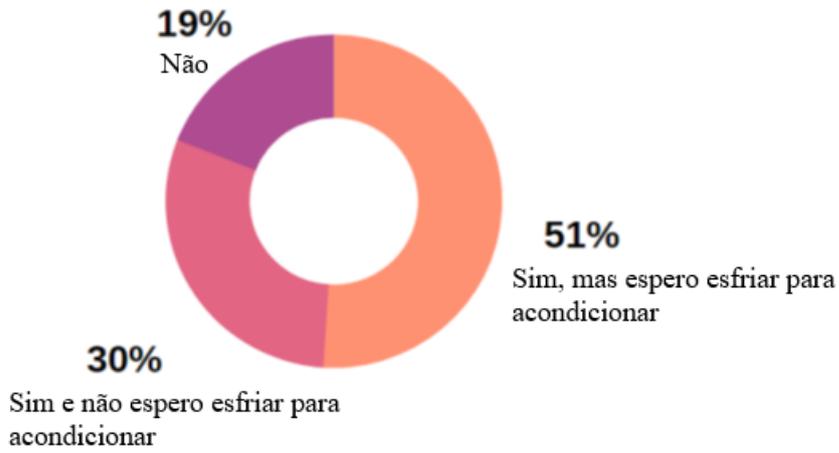
5.1.1 Utilização de plásticos

Todas as pacientes foram questionadas a respeito da utilização de plásticos e sua frequência na rotina.

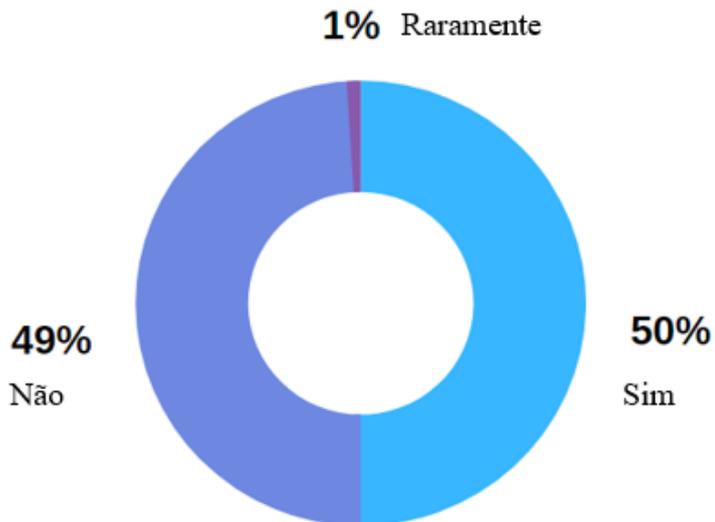
Na Figura 8 estão demonstradas as perguntas e respostas a respeito da utilização de plástico das pacientes e suas respectivas porcentagens.

Figura 8 – Questionário sobre a utilização de plásticos na rotina.

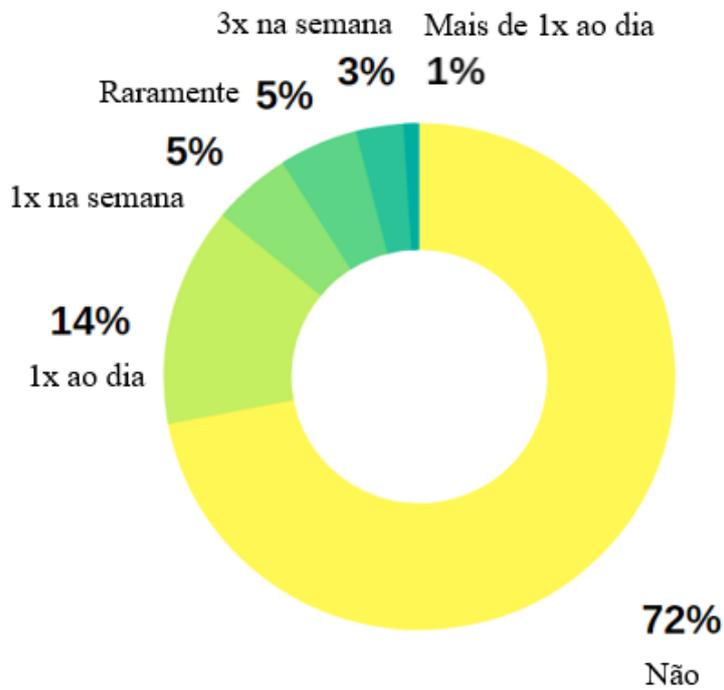
A Você tem o costume de acondicionar comida/líquidos quentes em recipientes plásticos?



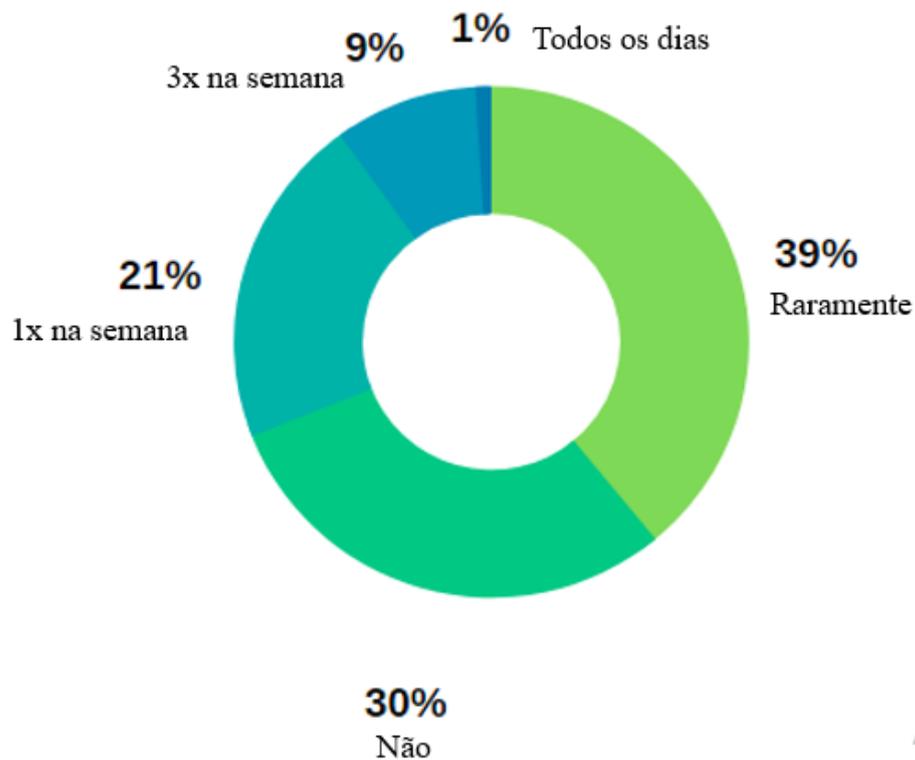
B Você tem o costume de esquentar comida/bebida em recipiente de plástico no microondas?



C Qual a frequência que você ingere líquidos quentes, como café e chá, em recipientes plásticos?



D Qual a frequência com que você ingere comida/bebida enlatada?



Resultados expressos em porcentagens. Fonte: a autora.

5.1.2 Avaliação da amamentação

Através de acompanhamento via telefone até 6 meses, em que as pacientes foram questionadas a respeito do aleitamento, crescimento infantil e possíveis complicações com a mãe ou com a criança, foi possível separar as mães em grupos, de acordo com a amamentação (Tabela 3).

Tabela 3 – Formas de aleitamento (N = 50).

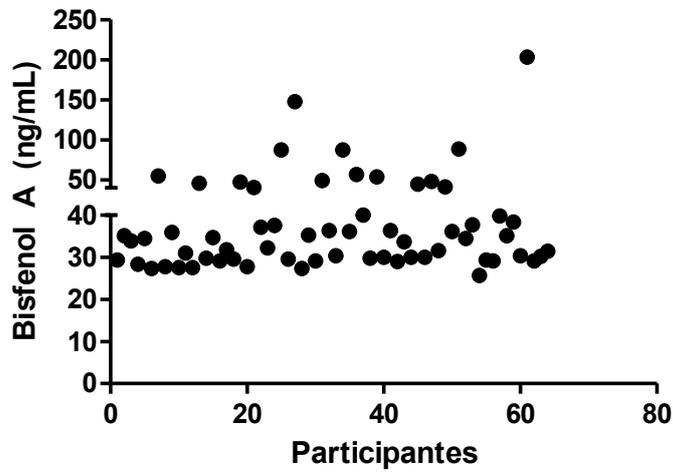
Forma de aleitamento	Frequência relativa
Amamentação exclusiva	78%
Aleitamento misto (leite materno + fórmula)	08%
Uso somente de fórmula	14%

Resultados expressos em porcentagens.

5.2 DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A (BPA) POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Das 64 pacientes em que foram analisadas as concentrações de BPA nas amostras de leite materno, todas elas apresentaram valores detectáveis pelo método de ELISA, resultando em uma mediana de 34,18 ng/mL (25,71 - 203,26). A Figura 9 representa a distribuição de BPA no leite materno das participantes avaliadas.

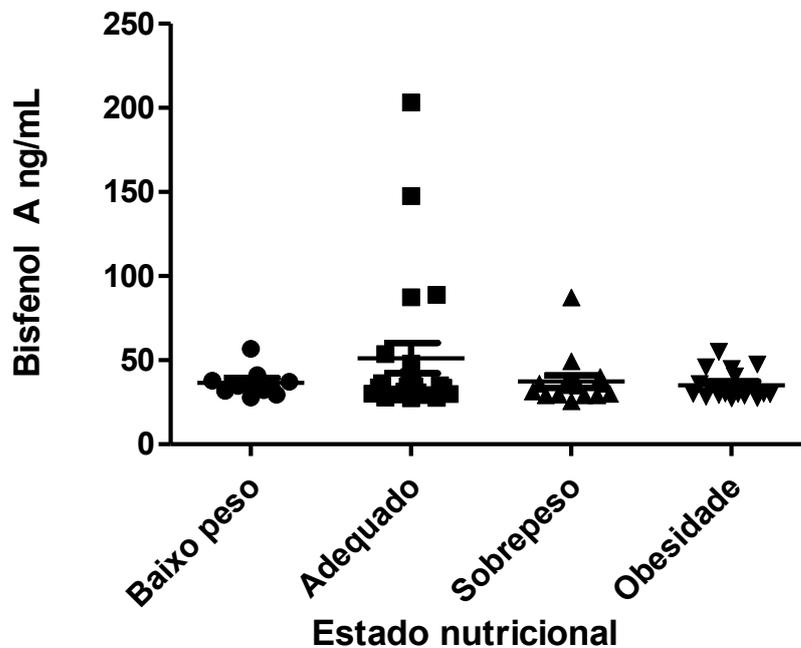
Figura 9 – Concentrações de Bisfenol A no leite materno pelo método de ELISA.



Fonte: a autora.

Também foi realizada uma comparação entre a concentração de BPA no leite materno e o estado nutricional da participante, de acordo com a tabela desenvolvida por Atalah e colaboradores em 1998 (Figura 10).

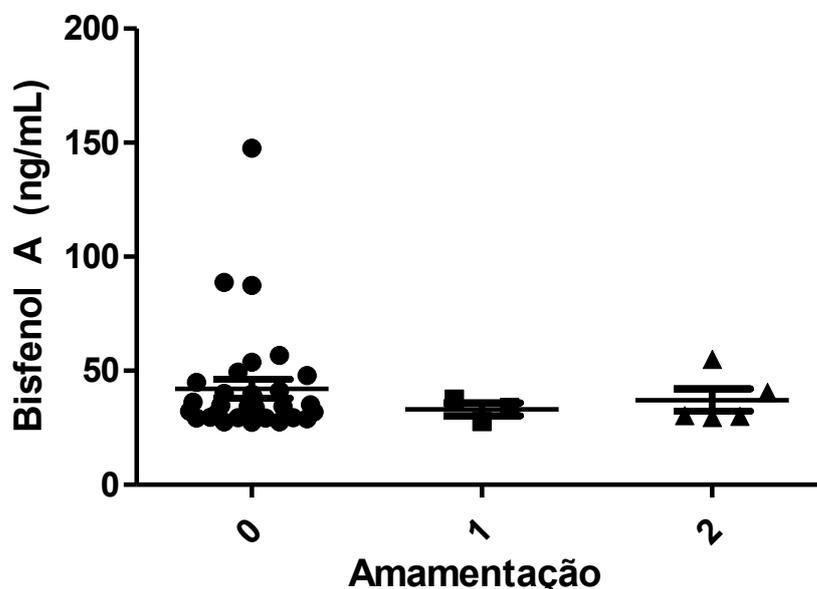
Figura 10 – Associação entre concentração de Bisfenol A e estado nutricional da participante



Fonte: a autora.

A concentração de BPA no leite materno também foi associada com a amamentação, para avaliar o mesmo como um desregulador da lactogênese II (Figura 11).

Figura 11 – Associação entre a concentração de bisfenol A e a amamentação



Legenda: 0 – leite materno exclusivo; 1 – aleitamento misto; 2 – uso exclusivo de fórmula. Fonte: a autora.

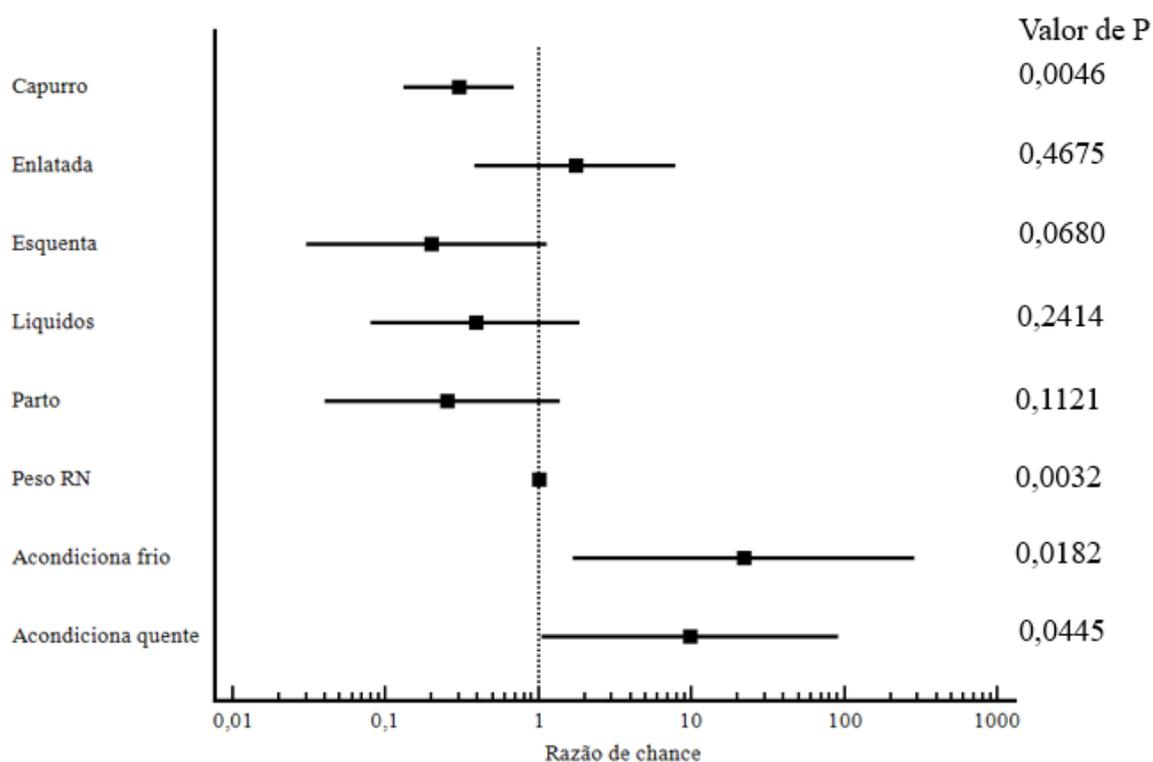
Pelo teste de Qui-quadrado, não existe associação estatisticamente significativa entre a concentração de BPA (baixa – abaixo de 34,18 ng/mL ou alta – acima de 34,18 ng/mL) e o hábito de esquentar alimentos dentro do recipiente plástico no micro-ondas ($P = 0,616$), ingerir líquidos em embalagens plásticas ($P = 0,248$), ingerir comida enlatada ($P = 0,790$) e acondicionar comida em embalagens plásticas ($P = 0,247$). Além disso, não foram encontradas associações significativas entre a concentração de BPA e o tipo de parto ($P = 0,790$) e a raça da participante ($P = 0,263$). A amamentação também não foi afetada pela concentração de BPA no leite materno ($P = 0,764$).

Por meio do teste de Mann-Whitney U, não foram encontradas diferenças significativas entre mães com BPA baixo e alto e o ganho de peso da mãe durante a gestação ($P = 0,354$), a duração do trabalho de parto ($P = 0,428$), o capurro ($P = 0,508$) e o peso do RN ($P = 0,368$).

Na regressão logística, as seguintes variáveis foram mantidas no modelo: capurro, participantes que comiam comida enlatada, esquentavam alimento em recipiente plástico no micro-ondas, bebiam líquidos quentes em plástico, acondicionavam alimentos antes ou após

esfriar em recipientes plásticos, tipo de parto e peso do RN ao nascer. ($P = 0,005$). A partir da regressão logística, obtiveram-se os seguintes resultados: mães que acondicionavam comida em recipientes plásticos e não esperavam esfriar para acondicionar apresentaram 22,05 vezes mais chances ($IC_{95\%} = 1,69$ a $287,64$; $P = 0,0182$) de terem concentrações de BPA altas em relação as pacientes que não acondicionavam comida em recipientes plásticos; mulheres que esperavam esfriar a comida para acondicionar em recipiente plástico apresentaram 9,81 vezes mais chances ($IC_{95\%} = 1,05$ a $91,06$; $P = 0,0445$) de terem concentrações de BPA altas no leite materno em relação as mães que não acondicionavam comida em material plástico. Os resultados da regressão logística estão expressos na Figura 12.

Figura 12 – Gráfico de floresta regressão logística



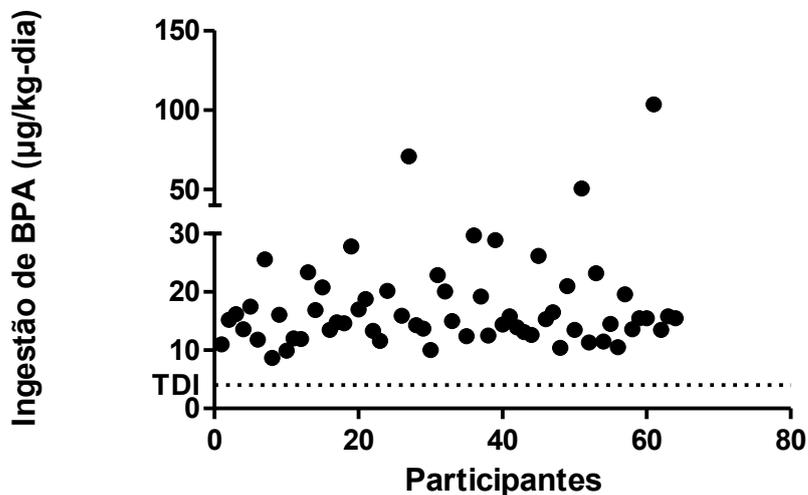
O gráfico de floresta representa os resultados da razão de chance e do intervalo de confiança 95%. O valor de P foi considerado significativo quando $P \leq 0,05$. Fonte: a autora.

5.3 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DO RN

Na abordagem determinística, o consumo médio de BPA pelo RN foi calculado seguindo a Equação demonstrada na seção 4.6.

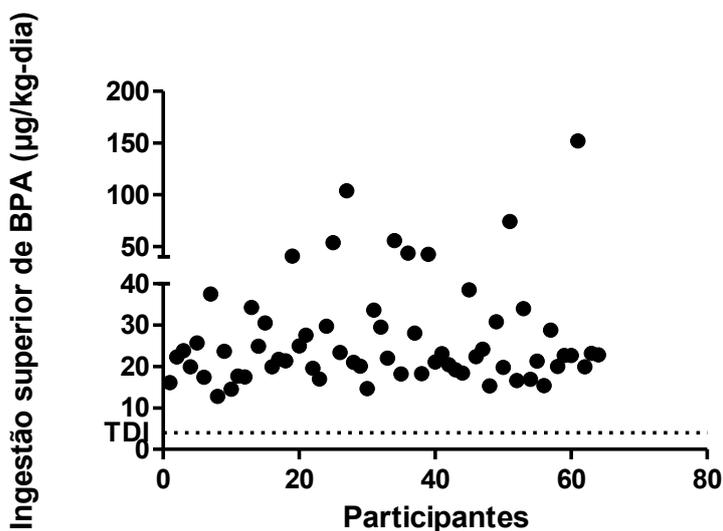
Na Figura 13 e Figura 14, tem-se a ingestão diária média de BPA pelos RNs e utilizando-se o percentil superior de consumo de leite, respectivamente.

Figura 13 – Ingestão de BPA pelo RN até o primeiro mês.



Legenda: TDI – ingestão diária máxima admissível, BPA – bisfenol A; RN: recém-nascido. Fonte: a autora.

Figura 14 – Ingestão de BPA pelo RN até o primeiro mês utilizando-se o percentil superior de consumo de leite



Legenda: TDI – ingestão diária máxima admissível; BPA – bisfenol A; RN – recém-nascido. Fonte: a autora.

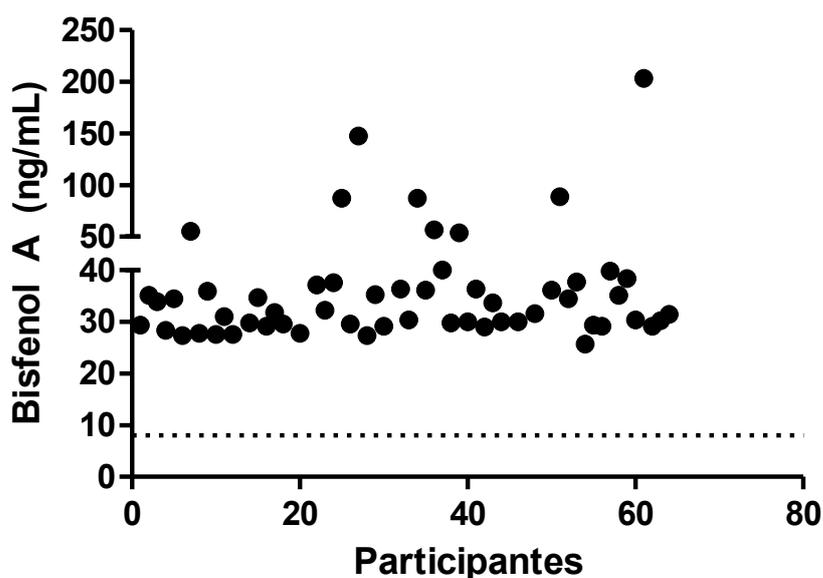
A partir dos cálculos, a mediana de concentração da ingestão de BPA pelo RN até o primeiro mês foi de 15,4 µg/kg-dia e de 22,5 µg/kg-dia para o percentil superior de consumo de leite.

5.3.1 Avaliação da concentração de BPA máxima admissível no leite materno

Após a utilização do cálculo: $C = TDI/M$, onde o TDI (ingestão diária máxima admissível) foi de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ e o M (taxa média de consumo de leite por dia) foi de 480 mL/kg-dia para meninas e 495 mL/kg-dia para meninos, calculou-se o C (concentração de BPA máxima admissível no leite materno) que foi de 8 ng/mL.

Portanto, todas as pacientes do estudo apresentaram concentrações de BPA no leite materno acima do limite superior calculado, como apresentado na Figura 15, em que a concentração de 8 ng/mL está destacada com uma linha tracejada.

Figura 15 – Representação das concentrações de Bisfenol A no leite materno acima da concentração máxima admissível.



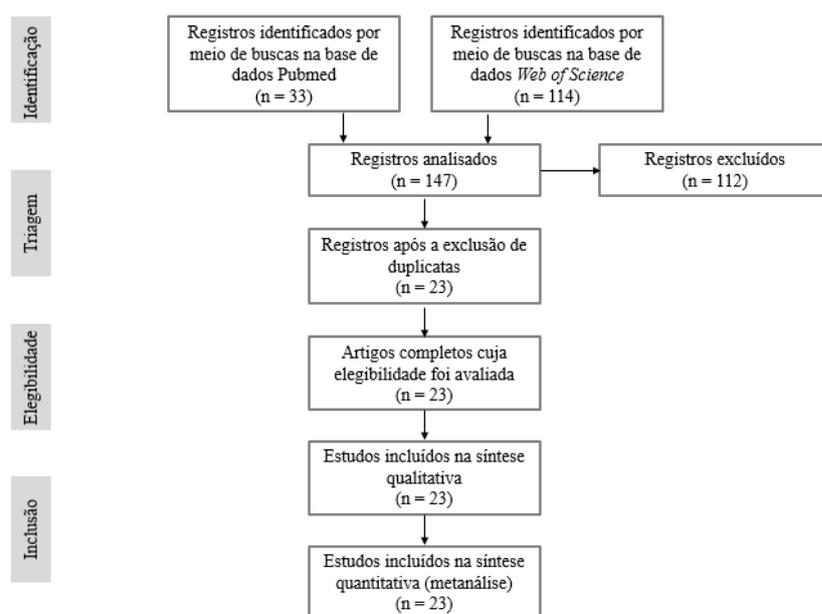
Fonte: a autora.

5.4 REVISÃO SISTEMÁTICA

Na base de dados *Pubmed*, foram encontrados 33 artigos no total, sendo que apenas 16 deles envolviam análise da concentração de BPA no leite materno humano. Já na base *Web of Science* foram encontrados 114 artigos no total e, entre eles, apenas 19 eram sobre o tema procurado. Dos 35 artigos encontrados nas duas bases de dados, 12 deles eram repetidos,

sendo assim, apenas 23 artigos que pesquisavam concentração de BPA no leite materno de humanos foram encontrados (Figura 16). A Tabela 4 apresenta a compilação dos dados da literatura.

Figura 16 – Fluxograma de seleção de estudos.



Fonte: a autora.

Tabela 4 – Compilação dos dados da literatura.

Referência	Ano	País	Método	N	Mediana (ng/mL)	Frequência de detecção (%)
ÁNGELES et al.	2019	ES	HPLC-MS/MS	53	0,26	76
ARBUCKLE et al.	2015	CA	GC-MS/MS	80	1,21	5
AZZOUZ; RASCÓN; BALLESTEROS.	2016	ES	GC-MS	6	2,15	66
BALLESTEROS; NAVALÓN.	2014	ES	GC-MS/MS e HPLC-MS/MS	10	5,45 e 5,75	75
BALLESTEROS; NAVALÓN.	2015	ES	UHPLC-MS/MS	10	1,53	80

CAO et al.	2015	CA	GC-MS	27 8	0,13 ppb	25,9
CARIOT et al.	2012	FR	SPE-UPLC- MS/MS	3	3,07	100
DECEUNINCK et al.	2015	FR	GC-MS/MS	30	0,13 ppb	86
DUTY, et al.	2013	US	LC-MS	30	1,3	100
HARTLE et al.	2018	US	GC-MS/MS	21	6,5 ppb	100
HINES et al.	2016	US	APCI/MS	34	1	61
KIM et al.	2018	KR	HRGC/HRMS	73	0,8	82
LEE et al.	2018	KR	HPLC-MS/MS	12 7	0,73	DNF
MENDONCA et al.	2015	US	SPE-UPLC- MS/MS	27	2,1	75
MIGEOT et al.	2013	FR	SPE-UPLC- MS/MS	21	1,87	90
NAKAO et al.	2015	JP	GC-MS	19	36 ppb	100
NIU et al.	2017	CN	LC-MS	20	0,089	85
PIENIAZEK, et al.	2019	PL	LC-QqQ-MS	20	1,13	100
TATEOKA et al.	2015	JP	ELISA	10	6,2	100
YI et al.	2013	KR	LC-MS/MS	32 5	7,8	70
YI; KIM; YANG.	2010	KR	HPLC-FD e LC- MS/MS	10 0	0,6 e 10,4	80 e 100
ZAFRA-GÓMEZ; BALLESTEROS; NAVALÓN.	2014	ES	UHPLC-MS/MS	10	1,55	60
ZIMMERS et al.	2014	US	LC-MS/MS	21	3,13	62

Siglas: KR – Coréia; CN – China; ES – Espanha; JP – Japão; FR – França; CA – Canadá; US – Estados Unidos; PL – Polônia; DNF – Dado não fornecido.

Sete estudos analisaram a concentração de BPA no leite maduro das pacientes, apenas um estudo avaliou no leite de transição, três coletaram leite de transição e maduro, dois coletaram colostro, alvo do nosso estudo e a maioria (dez) não especificaram o tipo de leite coletado. Além disso, os locais de coleta variaram entre hospitais universitários (dois estudos), hospitais gerais (seis estudos), centros de pesquisa (três estudos), banco de leite (um estudo) e clínicas (onze estudos).

A metodologia mais utilizada para a análise do BPA no leite foi a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas, seguido da cromatografia gasosa.

Separando as concentrações de BPA por continente, a Ásia apresentou os resultados mais altos, devido à elevada concentração encontrada na Coreia e Japão, resultado numa mediana de 3,5 ng/mL, enquanto a China apresentou a menor concentração de BPA encontrada nos 23 artigos. A Europa apresentou uma mediana de 1,55 ng/mL, seguido da América do Norte, com uma mediana de 1,3 ng/mL. Entretanto, avaliando o continente americano, percebe-se que há uma grande discrepância entre a frequência de detecção e a mediana das concentrações de BPA entre Canadá e Estados Unidos. Avaliando apenas os Estados Unidos separadamente, a mediana da concentração sobe para 3,13 ng/mL, quase tão alta quanto no continente asiático.

O estudo de Kim e colaboradores (2018), além da avaliação de BPA, avaliou a concentração de outros ftalatos, metais pesados e poluentes orgânicos no neurodesenvolvimento infantil, através da análise do leite materno, sangue do cordão umbilical, soro e urina maternos, tendo como resultado a associação da ingestão do BPA com a diminuição do neurodesenvolvimento infantil. Já o estudo de Lee e colaboradores (2018) apresenta a distribuição do BPA no soro materno e infantil, urina materna e infantil, placenta, leite materno e no sangue do cordão umbilical, demonstrando a contaminação da criança com o analito.

Já o estudo de Niu e colaboradores (2017) mostrou, além da concentração do BPA, a dos seus análogos e derivados também no leite materno, concluindo que o BPA foi o analito mais encontrado no leite, seguido do BPF, resultado também encontrado nos estudos de Deceuninck e colaboradores (2015), Nakao e colaboradores (2015) e Cariot e colaboradores (2012). O artigo de Azzouz, Rascón e Ballesteros (2016) determinou as concentrações de parabens, alquilfenóis, fenilfenóis, BPA e triclosan em amostras de urina, sangue e leite maternos, sendo que a maioria das amostras continham os analitos.

O estudo de Tateoka e colaboradores (2015) fez uma comparação entre as concentrações de BPA no leite materno antes e depois do consumo de café enlatado,

resultando em um aumento significativo da concentração em 1 a 2 horas após o consumo. Arbuckle e colaboradores (2015) avaliaram a exposição da mãe e da criança ao BPA e ao triclosan através da análise da urina materna e infantil, fórmula infantil, leite materno e mecônio, demonstrando que tanto a mãe quanto a criança sofreram exposição aos analitos.

Hines e colaboradores (2016) apresentam as diferentes concentrações de BPA e outros fenóis e parabenos no leite, urina e soro maternos, demonstrando que a urina e leite materno são matrizes adequadas para análise da exposição ao BPA. Zafra-goméz, Ballesteros e Navalón (2014) determinaram a concentração de BPA e diferentes desreguladores endócrinos no leite materno, mostrando que a exposição da criança a esses analitos não ocorre apenas através da placenta, mas também através da amamentação, assim com o artigo de Ballesteros e Navalón (2014).

Zimmers e colaboradores (2014) determinaram a concentração de BPA livre no leite materno, resultando em uma maior exposição ao analito em mães caucasianas quando comparadas as mães não caucasianas. O estudo de Duty e colaboradores (2013) avaliou a concentração de BPA em amostras de leite materno, fórmula infantil e amostras de urina infantil de recém nascidos prematuros, mostrando uma associação positiva entre a quantidade de dispositivos médicos utilizados e a exposição ao BPA.

Mendonca e colaboradores (2015) determinaram as concentrações de BPA no leite materno e urina infantil e encontraram o analito em quase todas as amostras, porém, não houve correlação significativa entre as concentrações de BPA no leite materno e na urina infantil. O estudo de Yi, Kim e Yang (2010) utilizou dois métodos diferentes para o biomonitoramento do BPA no leite materno, e ao fim, recomendou o método de LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas) para a confirmação da concentração do analito.

O artigo de Ángeles e colaboradores (2019) comparou a concentração de BPA e alguns derivados no leite materno e na fórmula infantil, demonstrando uma maior concentração no leite sintético, reforçando então que o leite materno deve ser sempre a primeira opção de nutrição infantil. O estudo de Pieniazek e colaboradores (2019) apresentou as concentrações de BPA e bisfenol S no leite materno, resultando em maior exposição da mãe ao BPA, que é variável de acordo com a utilização de plásticos na rotina.

Hartle e colaboradores (2018) compararam a concentração de BPA e outros contaminantes químicos no leite materno *in natura* e pasteurizado, sendo que a pasteurização não afetou a concentração dos contaminantes. O artigo de Cao e colaboradores (2015) avaliou

as concentrações de BPA livre e total no leite materno, resultando em baixas concentrações e baixa porcentagem de detecção em mulheres canadenses.

O estudo de Migeot e colaboradores (2013) utilizou o colostro das mães para avaliação do BPA e seus derivados, resultando numa confirmação da hipótese de que os humanos estão expostos também ao BPA clorado através de água contaminada. Yi e colaboradores (2013) também utilizaram o colostro das mães para avaliação do BPA e outros desreguladores endócrinos, demonstrando que a maioria dos neonatos estavam expostos ao BPA.

5.4.1 Avaliação da qualidade dos artigos

Após a avaliação da qualidade dos artigos a partir do sistema de pontuação apresentado por Loney, et al. (1998), obteve-se o escore apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Escore de pontuação dos artigos.

Artigos	Escore total
ÁNGELES et al. (2019)	7
ARBUCKLE et al. (2015)	7
AZZOUZ; RASCÓN; BALLESTEROS. (2015)	5
BALLESTEROS; NAVALÓN. (2014)	6
BALLESTEROS; NAVALÓN. (2015)	4
CAO et al. (2015)	6
CARIOT et al. (2012)	3
DECEUNINCK et al. (2015)	7
DUTY, et al. (2013)	7
HARTLE et al. (2018)	6
HINES et al. (2016)	3
KIM et al. (2018)	7
LEE et al. (2018)	6
MENDONCA et al. (2015)	5
MIGEOT et al. (2013)	4
NAKAO et al. (2015)	6
NIU et al. (2017)	5

PIENIAZEK, et al. (2019)	5
TATEOKA et al. (2015)	3
YI et al. (2013)	8
YI; KIM; YANG. (2010)	5
ZAFRA-GÓMEZ; BALLESTEROS; NAVALÓN. (2014)	6
ZIMMERS et al. (2014)	6

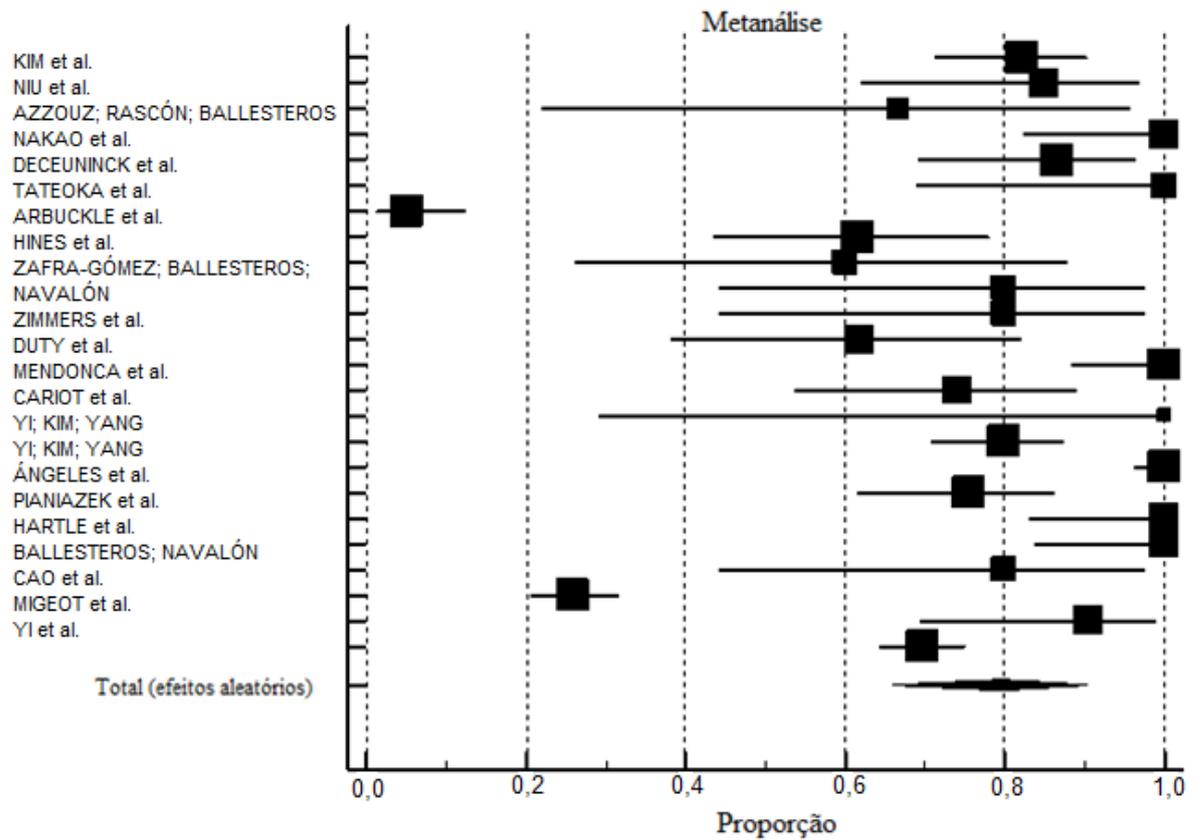
Resultados expressos em números variando de 0 a 8.

5.5 METANÁLISE

Os resultados da metanálise mostraram um percentual de 79% de frequência de detecção do BPA avaliando todos os artigos estudados, com um intervalo de confiança de 66% a 90%.

Devido à presença de heterogeneidade entre a frequência de detecção de BPA nos estudos ($P < 0,0001$ e $I^2 = 96,43\%$) foi aplicado o modelo de efeitos aleatórios, representado pelo gráfico de floresta (Figura 17).

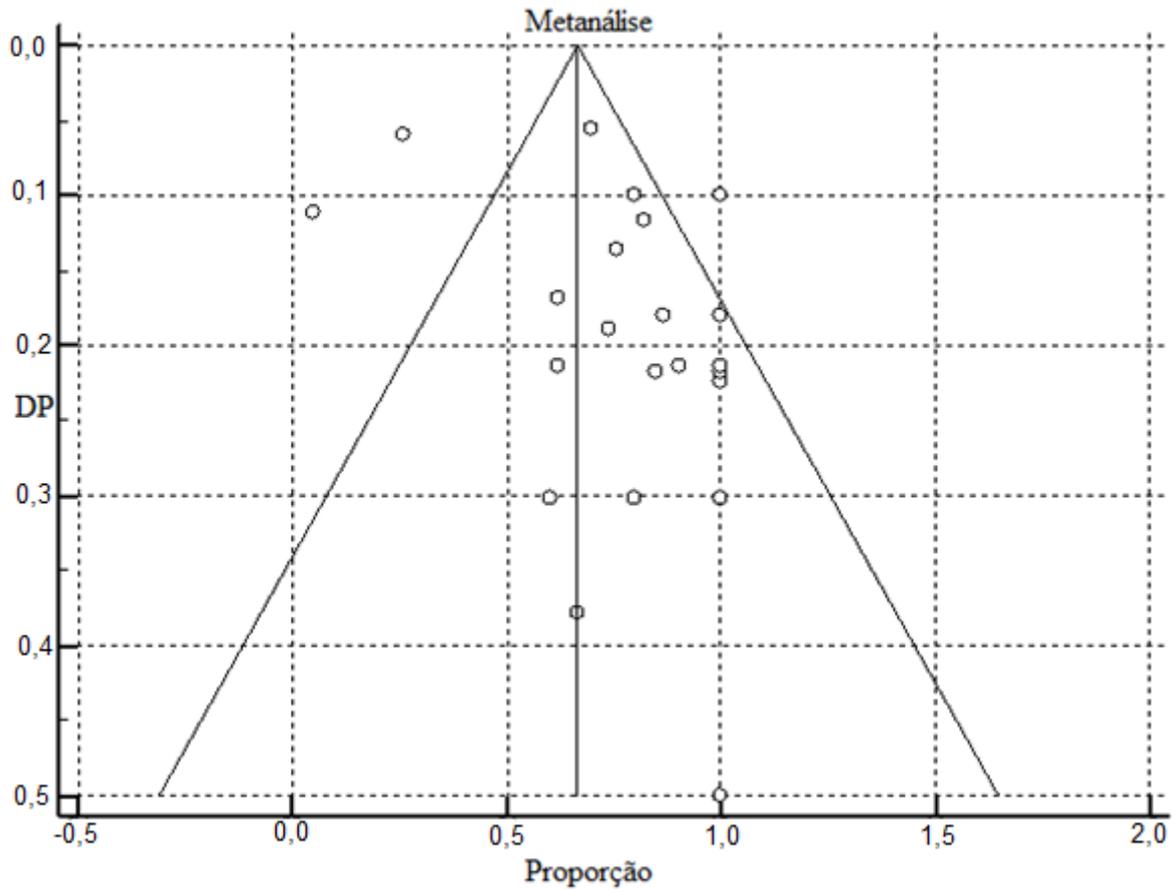
Figura 17 – Gráfico de floresta.



Resultados expressos em proporção e intervalo de confiança 95%.

Para confirmação da heterogeneidade, foi utilizada a representação pelo gráfico de funil (Figura 18), sendo que quanto mais distante da média central do funil, mais heterogêneas são as frequências de detecção encontradas nos estudos.

Figura 18 – Gráfico de funil.



Legenda: DP – desvio padrão. Resultados expressos em proporção e desvio padrão.

Além disso, também foi realizada a metanálise separada por países, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Metanálise separada por países

País	Frequência de detecção (%)	P	I ²
Canadá	14	P < 0,0001	95,49%
Espanha	73	P = 0,8967	0,00%
EUA	83	P < 0,0001	89,49%
França	87	P = 0,8631	0,00%
Japão	98	P = 0,8296	0,00%
Coréia	85	P < 0,0001	96,57%

Legenda: I^2 - inconsistência. Valor de P foi considerado estatisticamente significativo quando $P < 0,05$.

Também foi realizada a metanálise separando os estudos pelos diferentes tipos de leite coletados para a análise: leite maduro (frequência de detecção: 56%; $P < 0,0001$; $I^2 = 97,28\%$), leite de transição e maduro (frequência de detecção: 93%; $P < 0,0001$; $I^2 = 97,16\%$), leite de transição (frequência de detecção: 66%; $P < 0,0001$; $I^2 = 97,34\%$), não especificado (frequência de detecção: 82%; $P < 0,0001$; $I^2 = 82,07\%$), resultando numa heterogeneidade entre as frequências de detecção quando separados dessa forma.

6 DISCUSSÃO

O BPA é um químico industrial que é amplamente utilizado para a produção de plástico policarbonato (utilizado para fabricação de materiais que entram em contato com alimento, como mamadeiras e recipientes para alimentos) e resinas epóxi (utilizadas como revestimento protetor para alimentos e bebidas enlatadas e como revestimento em tampas metálicas para frascos de vidro e garrafas). Esses usos resultam na exposição do consumidor ao BPA por meio da dieta (WHO, 2010).

Alguns estudos tem examinado a associação entre a exposição do BPA e doenças perinatais, IMC e neurodesenvolvimento em crianças, que são o maior grupo de risco. O estudo de Wolff e colaboradores utilizou uma única concentração urinária de BPA (mediana = 1,3µg/L) da mãe no terceiro trimestre de gravidez. Este estudo demonstrou que as concentrações urinárias de BPA em mulheres grávidas no terceiro trimestre foram associadas com elevações modestas (embora não estatisticamente significativas) no peso da criança ao nascer (WOLFF et al., 2010). Já o estudo de Braun e colaboradores avaliou a relação entre a concentração urinária de mulheres grávidas (mediana = 2,0 µg/L) com resultados neurocomportamentais. Este estudo encontrou uma associação positiva entre as concentrações urinárias de BPA medidas durante a gravidez e comportamentos de agressividade e hiperatividade utilizando o Sistema de Avaliação Comportamental para Crianças-2 (BASC-2 (BRAUN et al., 2009). Estes estudos demonstraram a presença de consequências negativas do BPA para a criança não só pela exposição após o parto mas também durante a gravidez.

Esses dados nos mostram a importância do controle da ingestão de BPA pela mãe, uma vez que a criança é exposta a esse xenobiótico através dela.

Uma revisão feita pela OMS concluiu que os bebês amamentados foram expostos ao BPA em uma média de 0,3 µg/kg por dia e 1,3 µg/kg no percentil 95 de peso corporal por dia (WHO, 2010). No presente trabalho encontrou-se uma média de 19,5 µg/kg-dia e 28,5µg/kg-dia no percentil 95, maior ao encontrado pela OMS.

No Canadá, desde 2008 estão sendo feitas pesquisas sobre as consequências da exposição ao BPA. Desde então o país incentiva as indústrias a reduzir as concentrações de BPA nas embalagens de alimentos e, principalmente em embalagens de fórmulas infantis, utilizando o princípio geral de ALARA (tão baixo quanto razoavelmente possível). Estudos feitos pelo país nas suas embalagens de alimentos infantis, mostraram que o BPA não era detectável em nenhuma amostra e que a indústria abandonou ou eliminou gradualmente o uso dele para a produção dessas embalagens (HEALTH CANADA, 2014);(HEALTH CANADA,

2009);(HEALTH CANADA, 2008). A revisão sistemática realizada no presente estudo mostrou que o Canadá foi o país com menores frequências de detecção de BPA no leite materno, o que pode ser por essas políticas de conscientização implantadas no país.

Nos Estados Unidos, em 2012, o FDA alterou seus regulamentos para não serem mais utilizadas resinas de polycarbonato em mamadeiras e copinhos de café. No ano seguinte o FDA ampliou a regulamentação proibindo o uso de resinas epóxi também no revestimento de embalagens para fórmulas infantis (FDA, 2019). Entretanto, ainda não há leis que proibam o uso dessas resinas em embalagens utilizadas por adultos, o que justifica porque nos estudos americanos (HINES et al., 2016); (ZIMMERS et al., 2014); (DUTY, 2013); (HARTLE et al., 2018) o BPA ainda é encontrado em concentrações elevadas no leite materno.

Na União Europeia, mesmo que o risco da exposição ao BPA ainda não tivesse sido totalmente estabelecido, determinou-se em 2011, como medida preventiva, que todas as embalagens infantis contendo BPA deveriam ser substituídas e ficou proibida a fabricação de produtos infantis utilizando este material. Em 2015 essa proibição se estendeu para todos os produtos, não só infantis (EFSA, 2015). Na revisão sistemática realizada para este trabalho, foram encontrados artigos que avaliaram as concentrações de BPA em amostras de leite materno, urina, entre outros, de habitantes de países como França, Espanha e Polônia, que fazem parte da União Europeia. Alguns destes artigos foram realizados antes da proibição total do BPA em 2015 e encontraram concentrações de BPA em leite materno que foram de 0,13 ppb a 5,75 ng/mL (DECEUNINCK et al., 2015);(BALLESTEROS; NAVALÓN, 2014). Estas concentrações são superiores a relatada por Ángeles et al. (0,26 ng/mL), que realizaram o seu estudo em 2019. Esses achados podem ser relativos a efetividade da proibição do uso do BPA para produção de plásticos na Europa.

No Japão, as indústrias relacionadas com recipientes plásticos para alimentos optaram por prevenir a exposição ao BPA voluntariamente desde os anos 90, desde então, não foram encontradas elevadas concentrações do BPA em recipientes alimentares (WHO, 2009). Porém, não há nenhuma lei proibindo o seu uso e essa falta de políticas públicas pode ser vista na alta frequência de detecção do BPA nos artigos analisados na revisão sistemática, em que o Japão apresentou 100% de frequência de detecção no leite materno.

O Ministério da Saúde chinês juntamente com outros cinco órgãos governamentais anunciaram o fim da produção de embalagens plásticas contendo BPA a partir de 1 de Junho de 2011. A maior preocupação eram as embalagens infantis, devido ao risco da exposição da criança ao esquentar o leite em mamadeiras plásticas, liberando grande quantidade de BPA

(IBFAN, 2019). O artigo realizado na China incluído na presente revisão sistemática apresentou a menor concentração de BPA (0,089 ng/mL) em leite materno.

Na Coreia ainda não há legislação que proíba a utilização de BPA na fabricação de utensílios plásticos e alguns estudos avaliados na revisão sistemática apresentaram altas concentrações do BPA no leite materno (10,4ng/mL, 7,8ng/mL) neste país (YI et al., 2013);(YI; KIM; YANG, 2010).

Os dados da metanálise realizada nos mostram que houve uma homogeneidade na frequência de detecção do BPA no leite materno nos estudos feitos na Espanha, França e Japão; e heterogeneidade nos estudos feitos no Canadá, EUA e Coreia. Não foi possível realizar a metanálise com os países China e Polônia por haver apenas um estudo em cada país. Este dado pode se dar como resultado das políticas públicas adotadas por estes países, demonstrando também que a concentração de BPA pode estar relacionado a fatores epidemiológicos e culturais.

No Brasil, foi criada a Resolução RDC N° 41, de 16 de setembro de 2011 que proíbe o uso de plásticos em mamadeiras infantis, entretanto, as lactantes podem sofrer exposição ao BPA pelo contato com produtos e embalagens plásticas destinadas aos adultos, podendo expor também o lactente através da ingestão do leite materno contendo o BPA.

Salvo melhor juízo, este é o primeiro estudo que avalia a concentração de BPA no leite materno das mães no Brasil e apresentou concentrações elevadas (mediana de 34,18 ng/mL) em comparação com os artigos encontrados em outros países. Mesmo que tenha sido criada a lei que proíbe o uso do BPA em mamadeiras, pode-se perceber que não é o suficiente para evitar a exposição da criança a esse xenobiótico. A falta de políticas públicas no Brasil que previnem a exposição ao BPA é preocupante, uma vez que os RNs estão expostos a ele por meio do leite materno e eles são o maior grupo de risco em relação as consequências da exposição.

A análise da regressão logística nos mostrou que mulheres que acondicionavam comida em material plástico apresentam mais chance de ter concentrações elevadas de BPA, mostrando a relação que existe entre esses fatores. Apesar de o consumo de enlatados e de o hábito de esquentar alimentos e ingerir líquidos em material plástico não ter apresentado RC significativas, eles foram mantidos no modelo de regressão, o que permite inferir que de alguma forma eles influenciam na chance de a mulher apresentar concentrações mais elevadas de BPA. Adicionalmente, o tempo de capurro e o peso do RN também influenciam significativamente nas chances da mãe apresentar concentrações mais altas de BPA, sugerindo uma relação entre esses fatores.

Não foram encontradas associações entre a concentração do BPA e a lactogênese II e esse resultado também pode ter sido afetado por haver um programa de incentivo ao aleitamento materno (CIAM) no HU-UFSC, hospital onde foram realizadas as coletas. O CIAM fornece auxílio a todas as mães internadas no HU-UFSC por ocasião do parto, para que elas consigam amamentar e principalmente continuar amamentando após receberem alta do hospital por pelo menos seis meses. A alta porcentagem de mães que continuaram amamentando nos meses seguintes é muito provavelmente uma consequência desse incentivo que elas recebem para o aleitamento materno.

Como discutido, há uma preocupação mundial com a exposição de crianças e lactentes ao BPA, devido as consequências negativas desse consumo a longo prazo. O presente trabalho encontrou concentrações elevadas deste xenobiótico no leite materno das mães de um hospital do Brasil, conseqüentemente, alta exposição do RN ao BPA, o que é de extrema importância para demonstrar a falta de políticas públicas no país que diminuam essa exposição, não só para as crianças, mas também para os adultos. Tornam-se necessários mais trabalhos avaliando a concentração em outros hospitais e locais do Brasil, para avaliar também se não há uma questão epidemiológica e cultural a respeito do uso de plásticos na rotina que influencie esses resultados.

7 CONCLUSÕES

A compilação dos resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- A técnica de ELISA detectou BPA no leite materno (colostró) de 100% das mães incluídas no estudo;
- A mediana de concentração de BPA no leite materno foi de 34,18 ng/mL;
- O acondicionamento de alimentos em plástico aumentam as chances de haver concentrações elevadas de BPA no leite materno;
- A exposição ao BPA não alterou o estado nutricional e nem a lactogênese II da mãe;
- Há heterogeneidade na frequência de detecção de BPA no leite materno entre as pesquisas realizadas em diferentes países;
- Há homogeneidade na frequência de detecção de BPA no leite materno entre os países Espanha, França e Japão;
- Houve uma alta concentração de BPA no leite materno das mães deste estudo em comparação com outros estudos;
- As crianças deste estudo estão mais expostas ao BPA através da ingestão do leite materno ultrapassando o limite máximo admissível.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, S. et al. Immune Markers in Breast Milk and Fetal and Maternal Body Fluids : A Systematic Review of Perinatal Concentrations. p. 171–186, [2011].

AKSOY, F.; TARAKC, M. Persistency of high proinflammatory cytokine levels from colostrum to mature milk in preeclampsia. v. 38, p. 712–716, 2005.

ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; LE-DOARE, K. M. Early Human Development Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**, v. 91, n. 11, p. 629–635, 2015.

AZZOUZ, A.; RASCÓN, A. J.; BALLESTEROS, E. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Simultaneous determination of parabens , alkylphenols , phenylphenols , bisphenol A and triclosan in human urine , blood and breast milk by continuous solid-phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry. v. 119, p. 16–26, 2016.

BALLESTEROS, O.; NAVALÓN, A. Gas chromatography and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk after stir-bar sorptive extraction &. **Journal of Chromatography A**, v. 1349, p. 69–79, 2014.

BEZIRTZOGLU, E.; TSIOTSIAS, A.; WELLING, G. W. Anaerobe Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 478–482, 2011.

BRANDTZAEG, P. Mucosal Immunity : Induction , Dissemination , and Effector Functions. p. 505–515, 2009.

BRAUN, J. M. et al. Research | Children ’ s Health Prenatal Bisphenol A Exposure and Early Childhood Behavior. v. 117, n. 12, p. 1945–1952, 2009.

CAPOROSSI, L.; PAPALEO, B. Exposure to bisphenol A and gender differences : from rodents to humans evidences and hypothesis about the health effects. v. 5, p. 15–19, 2015.

CONSULTATION, W. H. O. OBESITY: PREVENTING AND MANAGING THE GLOBAL EPIDEMIC Report of a. 2000.

CONTACT, F.; JANUARY, A.; MARCH, U. Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact Application. n. January 2010, p. 1–8, 2019.

CORBEL, T. et al. Bidirectional placental transfer of Bisphenol A and its main metabolite , Bisphenol A-Glucuronide , in the isolated perfused human placenta. **Reproductive Toxicology**, v. 47, p. 51–58, 2014.

DECEUNINCK, Y. et al. Determination of bisphenol A and related substitutes / analogues in human breast milk using gas chromatography-tandem mass spectrometry. n. 80, p. 2485–2497, 2015.

DEUGARTE, C. M. et al. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. v. 83, n. 5, 2005.

DIRECTORATE, F.; PRODUCTS, H.; BRANCH, F. Bisphenol A : Update on the Food Directorate ' s Risk Management Commitments for Infant Formula. p. 1–4, 2014.

DISEASE, L. Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults. p. 259–265, 2002.

DONOHUE, D. R. et al. Article The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 5, p. 517–526, 2011.

DRAGO, L. et al. Microbiota network and mathematic microbe mutualism in colostrum and mature milk collected in two different geographic areas : Italy versus Burundi. v. 11, n. 4, p. 875–884, 2016.

DUALDE, P. et al. Science of the Total Environment Biomonitoring of bisphenols A , F , S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants. **Science of the Total Environment**, v. 668, p. 797–805, 2019.

DUTY, A. S. M. Potential Sources of Bisphenol A in the Neonatal Intensive Care Unit. v. 131, n. 3, p. 483–489, 2013.

EDMOND, K.; ZAIDI, A. New Approaches to Preventing , Diagnosing , and Treating Neonatal Sepsis. v. 7, n. 3, p. 1–8, 2010.

ELADAK, S. et al. A new chapter in the bisphenol A story : bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. n. 2, p. 11–21, [s.d.].

FACILITIES, B. I. N. **GUIDELINE** : [s.l: s.n.].

FAO, J.; MEETING, W. H. O. E. Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A Report of Joint FAO / WHO Expert Meeting. n. November, 2010.

FOOD, I.; AUTHORITIES, S. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) BISPHENOL A (BPA) - Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO. n. November, p. 1–6, 2009.

FUJITA, M. et al. In Poor Families , Mothers ' Milk is Richer for Daughters than Sons : A Test of Trivers – Willard Hypothesis in Agropastoral Settlements in Northern Kenya. v. 59, n. May, p. 52–59, 2012.

GEDDES, D. T. Inside the Lactating Breast : The Latest Anatomy Research. 2007.

GIORDANO, A. et al. White , brown and pink adipocytes : the extraordinary plasticity of the adipose organ. 2014.

GUNDERSON, E. P. et al. HHS Public Access. v. 163, n. 12, p. 889–898, 2016.

HANDBOOK, E. F. 15. Human Milk Intake 15.1. p. 43–44, 2005.

HARTLE, J. C. et al. Chemical Contaminants in Raw and Pasteurized Human Milk. 2018.

HINES, E. P. et al. HHS Public Access. n. 919, p. 120–128, 2016.

HUANG, Y. Q. et al. Bisphenol A (BPA) in China : A review of sources , environmental levels , and potential human health impacts. **Environment International**, v. 42, p. 91–99, 2012.

HUO, W. et al. Maternal urinary bisphenol A levels and infant low birth weight : A nested case – control study of the Health Baby Cohort in China. **Environment International**, v. 85, p. 96–103, 2015.

HURLEY, W. L.; THEIL, P. K. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. p. 442–474, 2011.

JEVITT, C.; HERNANDEZ, I.; GROËR, M. Lactation Complicated by Overweight and Obesity : Supporting the Mother and Newborn. 2007.

KOROTKOVA, M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal Lars A. p. 275–281, 2002.

LEGEAY, S. Is bisphenol A an environmental obesogen ? v. 31, p. 594–609, 2017.

LOPEZ, C.; MÉNARD, O. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Human milk fat globules : Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 29–41, 2011.

MA, E. B. et al. Delayed Onset Lactogenesis II Predicts the Cessation of Any or Exclusive Breastfeeding. **The Journal of Pediatrics**, v. 161, n. 4, p. 608–614, 2012.

MAHESHWARI, A. et al. Interleukin-8 / CXCL8 Forms an Autocrine Loop in Fetal Intestinal Mucosa. v. 56, n. 2, p. 240–249, 2004.

MATERIALS, F. C. et al. Scientific opinion on bisphenol A (2015) What is bisphenol A and what has EFSA done ? What are the main results of EFSA ’ s 2015 risk assessment of BPA ? EFSA ’ s risk assessment in more detail What potential health effects of BPA has EFSA identified ? 2015.

MATIAS, S. L. et al. Maternal prepregnancy obesity and insulin treatment during pregnancy are independently associated with delayed lactogenesis in women with recent gestational diabetes mellitus 1 – 4. 2014.

MCLACHLAN, J. A.; MARTIN, M. Endocrine disrupters and female reproductive health. v. 20, n. 1, p. 63–75, 2006.

MCNALLY, S.; STEIN, T. Chapter 1 Overview of Mammary Gland Development: A Comparison of Mouse and Human. v. 1501, [s.d.].

MIYAWAKI, J. et al. Perinatal and Postnatal Exposure to Bisphenol A Increases Adipose Tissue Mass and Serum Cholesterol Level in Mice. p. 245–252, [s.d.].

MIZUNO, K. et al. Mastitis Is Associated with IL-6 Levels and Milk Fat Globule Size in Breast Milk. p. 1–5, 2012.

MOLINARI, C. E. et al. Proteome Mapping of Human Skim Milk Proteins in Term and Preterm Milk. 2012.

MONOLAYERS, C.-C. et al. Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase. p. 1619–1625, 2009.

MORA-MAGAN, I. et al. Immune response to nucleotide-supplemented infant formulae : systematic review and meta-analysis. p. 64–67, 2007.

N, P. D. E. L. E. I.; INICIAL, P. Projeto de lei n.º 5.483, de 2016. v. 2016, p. 1–6, 2016.

NEWBURG, D. S.; WALKER, W. A. Protection of the Neonate by the Innate Immune System of Developing Gut and of Human Milk. v. 61, n. 1, p. 2–8, 2007.

NIH. **No Title.** Disponível em: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-bpa/index.cfm#further_reading>.

NOMMSEN-RIVERS, L. A. Does Insulin Explain the Relation between Maternal Obesity and Poor Lactation Outcomes ? An Overview of the Literature 1 – 4. p. 407–414, 2016.

NOVOTNÁ, O.; KOCOURKOVÁ, I. Cytokine expression in the colostrum cells of healthy and allergic mothers. p. 215–219, 2012.

OBJECTIVE, A. Maternal Obesity , and Gestational Diabetes Mellitus. v. 115, n. 3, 2005.

PAN, H.; GUO, J.; SU, Z. Physiology & Behavior Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity ☆. **Physiology & Behavior**, v. 130, p. 157–169, 2014.

PANDYA, S.; MOORE, R. G. Breast Development and Anatomy. v. 54, n. 1, p. 91–95, 2011.

PEDREIRA, C. E.; PINTO, F. A. Padrões de peso ao nascimento por idade gestacional no Brasil. p. 1–15, [s.d.].

PERGIALIOTIS, V.; KOTROGIANNI, P.; CHRISTOPOULOS-, E. ST AC. v. 7058, n. August, 2017.

PRESS, S. Stop Press Bpa Sept 2012 STOP PRESS : Brazil , China , Malaysia and now the USA follow the EU with bans on BPA in feeding bottles and infant food containers. p. 1–7, 2019.

PREUSTING, I. et al. Obesity as a Predictor of Delayed Lactogenesis II. 2017.

RAMSAY, D. T. et al. Ultrasound Imaging of Milk Ejection in the Breast of Lactating Women. v. 113, n. 2, 2004.

RASMUSSEN, K. M.; KJOLHEDE, C. L. Prepregnant Overweight and Obesity Diminish the Prolactin Response to Suckling in the First Week Postpartum. v. 113, n. 5, 2004.

RICHERT, M. M. et al. An Atlas of Mouse Mammary Gland Development. v. 5, n. 2, 2000.

ROCHESTER, J. R. Bisphenol A and human health: A review of the literature. **Reproductive Toxicology**, v. 42, p. 132–155, 2013.

SAÚDE, M. DA. **No Title.** Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0041_16_09_2011.html>.

SERVICES, H. The Surgeon General's Call to Action to Support Breastfeeding 2011. 2011.

SHIMIZU, M. et al. Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. v. 16, p. 549–556, 2002.

SKLEDAR, D. G.; MA, L. P. Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? v. 47, p. 182–199, 2016.

STANDARDS, C. W.; POLICY, C.; US, C. Health Risk Assessment of Bisphenol A from Food Packaging Applications. 2013a.

STANDARDS, C. W.; POLICY, C.; US, C. Survey of Bisphenol A in Canned Powdered Infant Formula Products. 2013b.

STANDARDS, C. W.; POLICY, C.; US, C. Survey of Bisphenol A in Canned Liquid Infant Formula Products. 2013c.

STATES, M. Global Nutrition Targets 2025. 2012.

TISSUE-SPECIFIC STEM CELLS Molecular Aspects of Adipoepithelial Transdifferentiation in Mouse Mammary Gland. p. 2756–2766, 2014.

TANAKA, K. et al. The pilot study: Sphingomyelin-fortified milk has a positive association with the neurobehavioural development of very low birth weight infants during infancy, randomized control trial. **Brain and Development**, v. 35, n. 1, p. 45–52, 2013.

TRUCHET, S.; BIOLOGIST, C.; HONVO-HOU, E. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism Physiology of milk secretion. v. 31, p. 367–384, 2017.

TURCK SIN, R. et al. Review Article Maternal obesity and breastfeeding intention , initiation , intensity and duration : a systematic review. p. 166–183, 2014.

VAFEIADI, M. et al. Association of early life exposure to bisphenol A with obesity and cardiometabolic traits in childhood. **Environmental Research**, v. 146, p. 379–387, 2016.

WARD, R. E. et al. In Vitro Fermentation of Breast Milk Oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. v. 72, n. 6, p. 4497–4499, 2006.

WOLFF, M. S. et al. Research | Children ' s Health Investigation of Relationships between Urinary Biomarkers of Phytoestrogens , Phthalates , and Phenols and Pubertal Stages in Girls. v. 118, n. 7, p. 1039–1046, 2010.

YI, B. et al. Association between Endocrine Disrupting Phenols in Colostrums and Maternal and Infant Health. v. 2013, 2013.

YI, B.; KIM, C.; YANG, M. Biological monitoring of bisphenol A with HPLC / FLD and LC / MS / MS assays &. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 27, p. 2606–2610, 2010.

YOUNG, B. E. et al. HHS Public Access. v. 21, n. 6, p. 1367–1376, 2018.

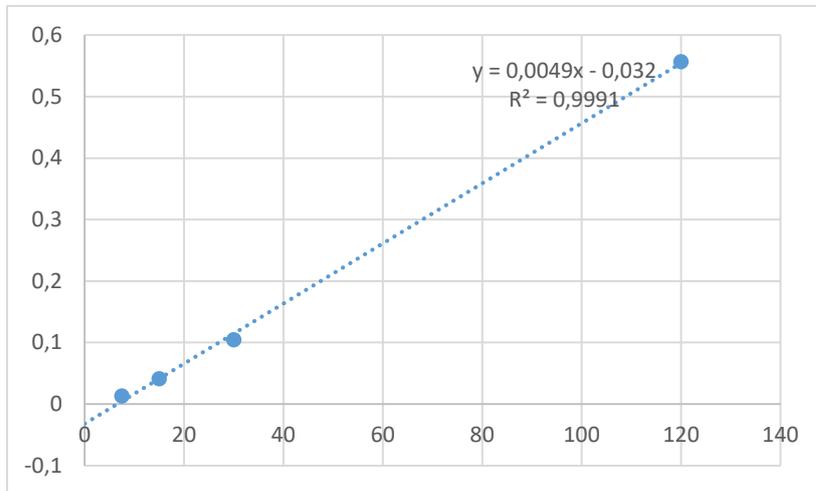
ZHAO, H. et al. The effects of bisphenol A (BPA) exposure on fat mass and serum leptin concentrations have no impact on bone mineral densities in non-obese premenopausal women. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 18, p. 1602–1606, 2012.

ZIMMERS, S. M. et al. Chemosphere Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of U . S . women using a sensitive LC / MS / MS method. **Chemosphere**, v. 104, p. 237–243, 2014.

ZIVKOVIC, A. M.; NORDING, M. L.; OHMAN, A. Biochemical and Biophysical Research Communications NMR-based metabolite pro fi ling of human milk : A pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation. v. 469, p. 626–632, 2016.

APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO

Figura 19 – Curva padrão BPA.



A absorbância do padrão foi analisada em duplicata. O resultado expresso refere-se a média de duas determinações.

APÊNDICE B – TABELA DE AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

Tabela 7 – Avaliação do estado nutricional da gestante segundo Índice de Massa Corporal (IMC) por semana gestacional

Semana gestacional	Baixo peso IMC \leq	Adequado IMC entre	Sobrepeso IMC entre	Obesidade IMC \geq
6	19,9	20,0 – 24,9	25,0 – 30,0	30,1
8	20,1	20,2 – 25,0	25,1 – 30,1	30,2
10	20,2	20,3 – 25,2	25,3 – 30,2	30,3
11	20,3	20,4 – 25,3	25,4 – 30,3	30,4
12	20,4	20,5 – 25,4	25,5 – 30,3	30,4
13	20,6	20,7 – 25,6	25,7 – 30,4	30,5
14	20,7	20,8 – 25,7	25,8 – 30,5	30,6
15	20,8	20,9 – 25,8	25,9 – 30,6	30,7
16	21,0	21,1 – 25,9	26,0 – 30,7	30,8
17	21,1	21,2 – 26,0	26,1 – 30,8	30,9
18	21,2	21,3 – 26,1	26,2 – 30,9	31,0
19	21,4	21,5 – 26,2	26,3 – 30,9	31,0
20	21,5	21,6 – 26,3	26,4 – 31,0	31,1
21	21,7	21,8 – 26,4	26,5 – 31,1	31,2
22	21,8	21,9 – 26,6	26,7 – 31,2	31,3
23	22,0	22,1 – 26,8	26,9 – 31,3	31,4
24	22,2	22,3 – 26,9	27,0 – 31,5	31,6
25	22,4	22,5 – 27,0	27,1 – 31,6	31,7
26	22,6	22,7 – 27,2	27,3 – 31,7	31,8
27	22,7	22,8 – 27,3	27,4 – 31,8	31,9
28	22,9	23,0 – 27,5	27,6 – 31,9	32,0
29	23,1	23,2 – 27,6	27,7 – 32,0	32,1
30	23,3	23,4 – 27,8	27,9 – 32,1	32,2
31	23,4	23,5 – 27,9	28,0 – 32,2	32,3
32	23,6	23,7 – 28,0	28,1 – 32,3	32,4
33	23,8	23,9 – 28,1	28,2 – 32,4	32,5
34	23,9	24,0 – 28,3	28,4 – 32,5	32,6

35	24,1	24,2 – 28,4	28,5 – 32,6	32,7
36	24,2	24,3 – 28,5	28,6 – 32,7	32,8
37	24,4	24,5 – 28,7	28,8 – 32,8	32,9
38	24,5	24,6 – 28,8	28,9 – 32,9	33,0
39	24,7	24,8 – 28,9	29,0 – 33,0	33,1
40	24,9	25,0 – 29,1	29,2 – 33,1	33,2
41	25,0	25,1 – 29,2	29,3 – 33,2	33,3
42	25,0	25,1 – 29,2	29,3 – 33,2	33,3

Fonte: ATALAH et al. Revista Médica de Chile, 1997.

**ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Citocinas pró-inflamatórias no leite materno: associação com o estado metabólico da mãe

Pesquisador: Fabiola Branco Filippin Monteiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68008317.4.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.081.185

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto da pesquisadora do departamento de Análises Clínicas que pretende investigar, junto a mulheres que amamentam a presença de citocinas pró-inflamatórias no leite materno correlacionado a situação do peso antes e depois de parto. Serão acompanhadas as mulheres que forem atendidas no hospital universitário. estas serão acompanhadas até seis meses após o parto. Devem fazer parte 400 mulheres.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar o perfil de citocinas pró-inflamatórias no leite materno e no soro de mães atendidas no HU-UFSC a fim de se estabelecer associações entre a lactogênese, o estado metabólico da mãe e as citocinas presentes no leite materno.

Objetivo Secundário:

- Determinar as concentrações séricas de marcadores de adiposidade (leptina, adiponectina), de inflamação (SAA e PCR), hormônios (prolactina e progesterona) e citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF-a, IL1-b e MCP-1) em mães atendidas no HU-UFSC por ocasião do parto;
- Determinar as concentrações de citocinas pró- inflamatórias (IL-6, TNF-a, IL1-b e MCP-1) no leite materno de mães atendidas no HU-UFSC por ocasião do parto;
- Determinar os constituintes do leite materno (%gordura, proteínas totais);

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-400

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

- Analisar dados clínicos da mãe e do RN e aspectos relacionados ao aleitamento materno (escore de amamentação) em até 6 meses após o parto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios:

As mães que aceitarem participar do estudo serão acompanhadas por 6 meses na tentativa de incentivo ao aleitamento materno exclusivo. Ainda, serão incentivadas e instruídas a comparecerem nas consultas mensais ao pediatra em sua Unidade Básica de Saúde ou pediatra de escolha na rede privada. As mães e acompanhantes serão acolhidos.

Riscos:

Existem os riscos de procedimentos de coleta de sangue, possíveis constrangimentos durante a entrevista e/ou quebra de confidencialidade dos dados coletados. No entanto, estes riscos serão potencialmente reduzidos pelos pesquisadores: A coleta de sangue será realizada em ambiente adequado e pela equipe da pesquisa que tomará todos os cuidados necessários para o mínimo de desconforto. Apesar disto, poderá haver a possibilidade de formação de hematoma e sensação dolorosa no local da coleta. Se isso acontecer, a equipe da pesquisa tomará as medidas necessárias para diminuir este desconforto. A coleta de leite materno será feita após a ordenha manual que acontece junto com as enfermeiras. O leite descartado será utilizado para a pesquisa. A entrevista para a coleta de algumas informações será realizada em ambiente tranquilo e discreto, sempre respeitando a individualidade e as necessidades de cada paciente. Será assegurado o direito a não responder a qualquer pergunta se achar que ela é muito pessoal ou se sentir desconfortável em falar. Os dados retirados do prontuário médico serão armazenados e manuseados com todo cuidado somente pelos pesquisadores para reduzir o risco de quebra de sigilo. Os dados telefônicos serão guardados em sigilo e somente os a equipe da pesquisa (01 professor e 01 aluno) terão acesso.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa encontra-se adequadamente fundamentada e documentada. Traz a documentação necessária para a tramitação. Apresenta um TCLE estruturado de acordo com as orientações da Resolução 466/2012.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE adequado às orientações da Resolução 466/2012. Contudo é necessário corrigir no endereço do CEPESH o prédio no qual este Comitê se localiza.

Recomendações:

corrigir o prédio de localização do CEPESH/UFSC no TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclusão: aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_878555.pdf	05/05/2017 17:43:24		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	05/05/2017 17:42:54	Fabiola Branco Filippin Monteiro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_assinada.pdf	05/05/2017 12:14:48	Fabiola Branco Filippin Monteiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_leite_materno.pdf	05/05/2017 12:12:51	Fabiola Branco Filippin Monteiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Leite_materno.pdf	05/05/2017 12:12:37	Fabiola Branco Filippin Monteiro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 25 de Maio de 2017

Assinado por:

Ylmar Correa Neto

(Coordenador)

ANEXO B – QUESTIONÁRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA
CAROLINA DUMKE DE SIQUEIRA

QUESTIONÁRIO PARA MESTRADO

Número prontuário: _____ Telefone/celular: _____
Nome: _____ Idade: _____
Peso pré gestacional: _____ Peso pós gestacional: _____ Altura: _____
Comorbidades: _____
Nível escolar: _____ Ocupação: _____
Tipo de parto: _____ Tempo: _____ Capurro: _____
Número de filhos: _____ Peso do RN: _____
Amamentações anteriores:

Complicações na gravidez: _____
Foi como planejou?

Fez acompanhamento nutricional? Sim Não Tempo: _____
Houve mudança nos hábitos alimentares? Durante e após gestação?

Praticava exercícios antes e durante gestação? Sim Não

Pretende começar ou manter?

Você tem o costume de acondicionar comida/líquidos quentes em recipientes plásticos?

- sim, e não espero esfriar para acondicionar
- sim, mas espero esfriar para acondicionar
- não, uso outro material

Você tem o costume de esquentar comida/bebida em recipiente de plástico no micro-ondas?

- sim
- não

Qual a frequência que você ingere líquidos quentes, como café e chá, em recipientes plásticos?

- 1x ao dia
- 3x na semana
- 1x na semana
- não costumo tomar líquidos quentes em material plástico

Qual a frequência com que você ingere comida/bebida enlatada?

- todos os dias e várias vezes ao dia.
- todos os dias
- 3x na semana
- 1x na semana