

Análise de elemento traço por absorção atômica em amostras de leite humano coletadas no Banco de Leite do Amapá[#]

An analysis of trace element by atomic absorption in samples of human milk collected in Amapá's Bank of Milk

Danilo Monteiro Monteiro*

Roberto Bezerra Messias**

341

Artigo Original • Original Paper
O Mundo da Saúde, São Paulo · 2014;38(3):341-348

Resumo

Este trabalho avaliou a concentração de minerais nos leites que são doados ao Banco de Leite do Estado do Amapá, por meio da técnica de absorção atômica, com o objetivo de fomentar a importância dessa análise na rotina dos Bancos de Leite para auxiliar nos tratamentos terapêuticos de recém-nascidos que possuem carência por determinado mineral. Após a quantificação desses teores, o leite poderia ter um fim intencional para tratamentos terapêuticos de recém-nascidos que possuem carência por determinado mineral. As análises quantitativas dos elementos presentes no leite foram para os teores de Ca, Cu, Zn, Mg, Mn, Na, Cd, Fe, Pb e K. Esses elementos foram escolhidos devido à importância e ao valor nutricional para absorção por recém-nascidos, assim como pela possibilidade de causar intoxicação aguda, como é o caso do Cd e o Pb, quais são comuns, em níveis baixos, em determinados alimentos e bebidas. Por exemplo, em uma amostra de leite foi verificado um teor de 1 ppm de Cd, sendo portanto um valor na média de contaminação. Os resultados das análises foram divididos em 4 zonas, representando os pontos de coleta do Estado do Amapá. Em duas zonas foram observados altos índices de Mn e Na. Ao se verificar todos os pontos do trabalho, notou-se que os testes foram satisfatórios, principalmente quanto ao comparativo com outros testes de absorção atômica e rótulos de leites comerciais. Enfim, observou-se nesse estudo que o método investigativo de metais em leite humano é de suma importância para fazer parte da rotina de Banco de Leites, principalmente para fins terapêuticos e nutricionais, analisando a qualidade e a quantidade de elementos químicos constituintes desse leite.

Palavras-chave: Leite Humano. Metais. Absorção Atômica.

Abstract

This work evaluated the concentration of minerals in milks which are donated to the Bank of Milk of Amapá State, by means of the technique of atomic absorption, with the aim to argue for the importance of this analysis in the routine of Banks of Milk do as to help in therapeutic treatments of newborn babies who have lack of some minerals. After quantifying these levels, the milk could have been used for therapeutic treatments for infants who have a certain mineral deficiency. Quantitative analysis of the elements presents in milk focused on Ca, Cu, Zn, Mg, Mn, Na, Cd, Fe, Pb and K. These elements were chosen because of their importance and nutritional value for absorption by newborns, as well as those that may cause acute intoxication, for example, Cd and Pb, which are common at low levels in certain foods and drinks. For example, in a milk sample a content of 1 ppm Cd was found, thereby being an average value of contamination. The results of the analysis were divided into 4 zones, representing the collection points in state Amapá. In two zones we observed high levels of Mn and Na. And, checking all points of the study, it was found that the tests were satisfactory, particularly as regards comparisons to similar tests for atomic absorption and commercial brands. Anyway, it was observed in this study that the investigative method of metals in human milk is of paramount importance so as to be recommended as a routine part of Milk Banks, especially for therapeutic and nutritional ends, by analyzing the quality and quantity of constituent elements of such milks.

Keywords: Milk, Human. Metals. Atomic Absorption.

DOI: 10.15343/0104-7809.20143803341348

[#] Artigo derivado de: "Monteiro DM. Análise de elementos traços por absorção atômica de forma quantitativa e qualitativa: uma Investigação do Valor Nutricional de Leites Humanos que Abastecem o Banco de Leite do Estado do Amapá [dissertação]. Macapá (AP): Universidade Federal do Amapá; 2013".

* Departamento de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS, Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, Macapá-AP, Brasil. E-mail: danilomcp@yahoo.com.br

** Departamento de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS, Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, Macapá-AP, Brasil.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais nutritivos relacionado ao desenvolvimento de um organismo humano. O leite é um produto complexo, composto por várias substâncias que estão em solução, suspensão ou emulsão em água, produzido por diferentes espécies de animais, inclusive o homem. Entre esses elementos temos a água, proteína, gordura, lactose, minerais, vitaminas e outros que também possuem a mesma relevância. Segundo Laurindo¹, os leites humano e de vaca diferem entre si na quantidade e qualidade desses elementos².

Os minerais encontrados no leite, especialmente o cálcio e o fósforo são essenciais para a estrutura dos ossos e dentes de indivíduos de todas as idades, sobretudo para lactantes e crianças³. A quantidade de ferro encontrada no leite é pequena, mas está sob a forma prontamente utilizável pelo organismo⁴. Segundo Sokol⁵, os sais minerais fazem parte de estruturas básicas como o cálcio nos ossos, o ferro no sangue, o sódio e o potássio nas células.

O aleitamento materno é imprescindível à qualidade de vida do bebê, principalmente em seu desenvolvimento orgânico e intelectual, pois apenas o leite materno é capaz de alimentá-lo com todos os nutrientes necessários para o bom funcionamento do seu organismo⁵, ressaltando a diversidade de minerais em sua composição⁶.

Portanto, este estudo teve intenção de avaliar a presença de metais em leite humano oriundos de Banco de leite, com intuito de se intensificar as interpretações quantitativas e qualitativas do alimento e ampliar o conhecimento sobre análise investigativa por meio de testes de Absorção Atômica, ressaltando-se, então, que há pouca referência sobre o assunto na literatura. Além de ser um método bastante eficaz para identificação de elementos traços em gêneros alimentícios, investigações por contaminação ambiental e para outras análises que possam ser identificadas pelo teste em questão. Encontramos o método de investigação de metais por absorção atômica em leite de animais, como, por exemplo, em leite de búfala⁷. Com base nos resultados, nota-se a necessidade de inserção do método para que faça parte do controle de qualidade desses leites

em Bancos de Leite, pois se trata da nutrição de recém-nascidos, com carência de um metal específico para seu desenvolvimento.

MÉTODO

Amostras

Para verificar a calibração do equipamento Absorção Atômica – Shimadzu, AA-6300, quanto a sua confiança dos resultados, algumas amostras de leites comerciais do tipo longa vida, integral e desnatado, adquiridos em mercados da cidade local, foram analisadas, quais possuíam em seus rótulos as concentrações dos componentes minerais.

A coleta foi realizada no período de março de 2012 a maio de 2013.

As amostras foram coletadas em frascos hermeticamente acondicionadas em cuba térmica e conduzidas ao laboratório. Os resultados de todas as amostras, mesmo as comerciais, foram comparados com os resultados da literatura.

As amostras de leite humano *in natura* foram cedidas pelo Banco de Leite do Estado do Amapá. Entretanto, as amostras não foram identificadas por dados pessoais, para a devida preservação da identidade dos doadores. Enfim, as amostras foram identificadas mediante localização de cadastro realizada no próprio banco de leite, porém com referências de A a D, fazendo alusão aos locais de coleta do Estado do Amapá.

A coleta das amostras foi feita em recipientes isotérmicos, hermeticamente fechados, destinadas ao Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), para a realização das análises químicas.

O método utilizado analisou as concentrações dos elementos químicos Ca, Cu, Zn, Mg, Mn, Na, Cd, Fe, K e Pb para ambas as amostras, e a análise dos resultados foi dividida em quatro zonas, de A a D, somando 16 amostras para cada zona. As zonas fazem alusão aos endereços das doadoras.

Preparo das Amostras

Colocaram-se 3,00 mL de cada amostra de leite, todos em triplicata, em cápsula de porcelana. Em seguida, a amostra foi seca em chapa de aquecimento e posteriormente incinerada em forno mufla a 450 °C, por 3 horas, até a formação de cinzas brancas. As cinzas foram dissolvidas em 2,5 mL de ácido nítrico

concentrado e transferidas quantitativamente para o balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água bidestilada.

Os brancos analíticos foram preparados pelo mesmo procedimento sem a adição da amostra.

Foi utilizado peróxido de hidrogênio para o clareamento das amostras mais escuras, posteriormente filtradas, para retirar as micropartículas resultantes da incineração.

Soluções de Referência

As soluções de referência dos metais Ca, Cu, Zn, Mg, Mn, Na, Cd, Fe, K e Pb, dispostas em ordem de análise, foram preparadas em béqueres com HNO₃ a 0,9 mol/L e CFA-C 10% v/v (pH = 8), para paramentar os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), compreendidos para curva de 2 a 10 ppm.

Reagentes e Soluções

Os reagentes e soluções utilizados foram: ácido Nítrico (HNO₃); padrões de solução de Ca, Cu, Zn, Mg, Mn, Na, Cd, Fe, K e Pb; água bidestilada; e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Instrumentação

O equipamento da investigação de qualificação e quantificação dos elementos foi o Espectrofotômetro de Absorção Atômica de Chama, da marca Shimadzu com modelo completo AA-6300.

O processo iniciou-se com a abertura da válvula de pressurização de gás, para o equipamento. Após isso, foi feita a abertura do programa de operação para fazer o “check list” da máquina. Em seguida, selecionou-se o elemento como parâmetro e verificou-se o tipo de lâmpada catódica compatível com o mesmo elemento em análise, considerando, também, os comprimentos de onda, a corrente elétrica das lâmpadas e a resolução espectral de cada elemento. Outro item verificado foi a plataforma, colocando-a no mesmo nível da emissão do feixe de luz.

Por fim, selecionaram-se no “software” os tubos com as amostras de referência para se criar uma curva padrão. Após a padronização, iniciou-se a leitura nos tubos com os analitos do trabalho, para quantificação da concentração dos elementos e posterior análise dos resultados.

Cada teste que o equipamento faz, retira-se cerca de 0,2 mL para completar a análise dos elementos. De forma geral, foram 64 tubos para cada leite humano.

Todos os resultados foram apresentados em forma de tabela do próprio software do equipamento, em concentrações de parte por milhão para cada elemento traço do leite analisado.

Neste estudo foram analisados também leites comerciais para se avaliar a eficiência do método, onde os valores foram comparados com seus rótulos, para demonstrar a aproximação dos resultados.

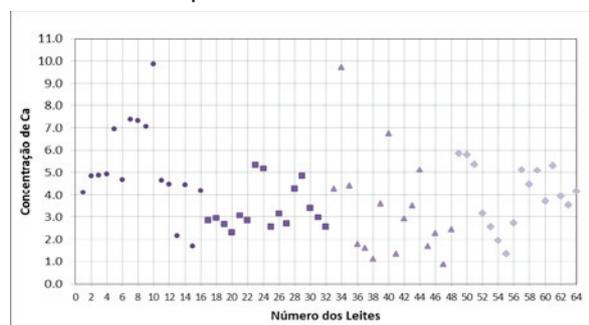
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados das análises para as concentrações dos elementos químicos Ca, Cu, Zn, Mg, Mn, Na, Cd, Fe, K e Pb em leite materno estão divididos em quatro zonas, de A a D, somando 16 amostras para cada zona. Ressalta-se que as zonas fazem alusão aos endereços das doadoras.

Cálcio

Para as concentrações de cálcio, os leites de número 10 e 34 (Figura 1) tiveram os maiores valores para o elemento, da Zona A e Zona C, respectivamente. A média aritmética entre todas as concentrações analisadas para cálcio foi de 3,9853 ppm, sendo um bom resultado para as concentrações de cálcio em leite materno, comparando-se com outros estudos de teores de leite.

Figura 1. Concentrações de Ca em amostras de leite humano coletadas em um Banco de Leite do estado do Amapá, 2012-2013



Legenda: Zona A: 1-16; Zona B: 17-32; Zona C: 33-48; Zona D: 49-64.

Esse elevado teor de cálcio é muito importante para alimentação de lactentes que nascem com hipocalcemia, pois o inserindo como parte da nutrição de um recém-nascido, este pode salvar sua vida elevando seus níveis de concentrações plasmáticas, podendo também evitar outras doenças como a tetania e o laringoespasmio.

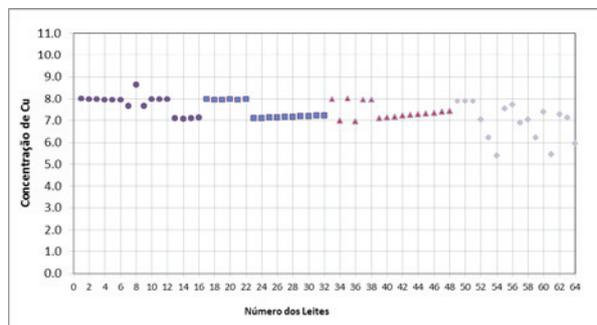
O leite da mãe de número 47 apresentou uma preocupante baixa de cálcio, o qual não ajudaria muito na nutrição de um recém-nascido, prejudicando ainda mais um tratamento para hipocalcemia. Caso clínico que poderia ser atenuado com a inserção do leite da mãe de número 34, na nutrição dessa criança.

Cobre

Podemos manter um tratamento adequado para carência de cobre pelos leites compreendidos entre 1 e 12 (Figura 2), pois os de número 13 a 16 estão com concentrações um pouco abaixo, mas, de qualquer modo, servem para auxiliar na recuperação do nível de cobre no organismo, como, por exemplo, para um diagnóstico de anemia microcítica hipocrômica.

Portanto, para uma dieta a base de cobre, a média de leites da Zona A, em ênfase o de número 8, com 8,6485 ppm do teor do elemento, seria bastante indicado para o tratamento específico da carência do elemento traço, evitando, por exemplo, futuras doenças cardiovasculares.

Figura 2. Concentrações de Cu em amostras de leite humano coletadas em um Banco de Leite do estado do Amapá, 2012-2013



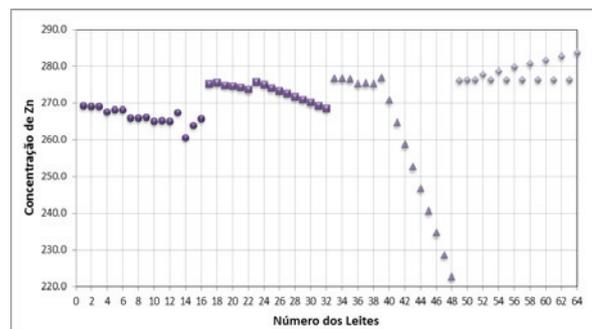
Legenda: Zona A: 1-16; Zona B: 17-32; Zona C: 33-48; Zona D: 49-64.

Zinco

A avaliação para os leites com elementos traços de zinco revela uma proporção bem mais alta do que para as concentrações de cobre, com uma diferença relativa de 200 ppm entre a maior concentração de cobre e a maior concentração de zinco, com um coeficiente de variação de aproximadamente 134%. Porém, a presença de zinco é mais comum por ser abundante no corpo humano. O maior valor nutritivo para o

elemento zinco está selecionado entre os leites da Zona D (Figura 3), com um valor mínimo de 278,1444 ppm de concentração, e um máximo de 283,6643 ppm. Leite que poderia ser eficaz em um tratamento específico para aumentar a imunidade de um prematuro.

Figura 3. Concentrações de Zn em amostras de leite humano coletadas em um Banco de Leite do estado do Amapá, 2012-2013

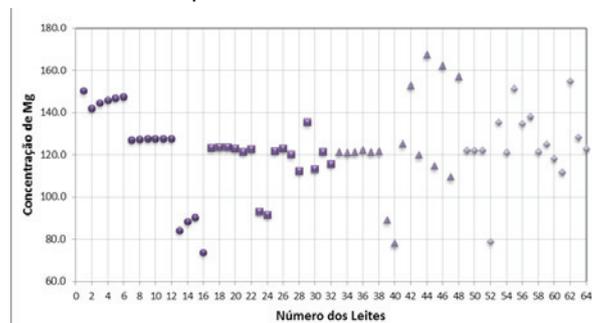


Legenda: Zona A: 1-16; Zona B: 17-32; Zona C: 33-48; Zona D: 49-64.

Magnésio

O magnésio é um importante elemento constituinte responsável por inúmeras funções metabólicas intracelulares. Por isso, a investigação por magnésio em leite humano pode ser determinante para um tratamento enriquecido por esse elemento. Em geral, a média de concentrações para o metal magnésio foi de 123,0169 ppm, compreendido entre o mínimo de 73,6259 e o máximo de 167,3220 ppm, observados na Figura 4, quantitativo que teria grande eficácia para o tratamento de disfunções musculares.

Figura 4. Concentrações de Mg em amostras de leite humano coletadas em um Banco de Leite do estado do Amapá, 2012-2013

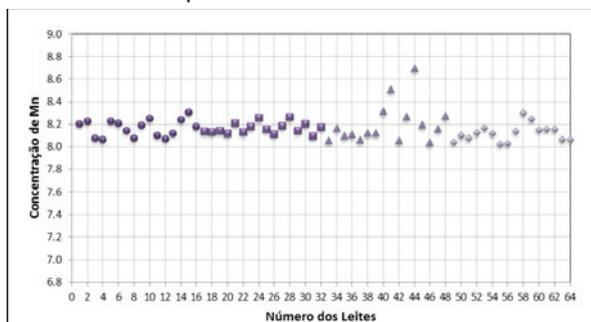


Legenda: Zona A: 1-16; Zona B: 17-32; Zona C: 33-48; Zona D: 49-64.

Manganês

Ao analisar a concentração de Mn em todos os leites (Figura 5), notou-se que a diferença entre os pontos foram apenas nas casas decimais, e que essa variação foi entre o mínimo de 8,0262 e o máximo de 8,6936 ppm, caracterizando, de certa forma, o teor de manganês em leite materno dos leites coletados.

Figura 5. Concentrações de Mn em amostras de leite humano coletadas em um Banco de Leite do estado do Amapá, 2012-2013

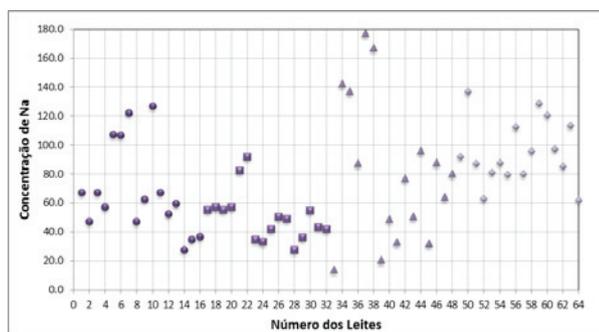


Legenda: Zona A: 1-16; Zona B: 17-32; Zona C: 33-48; Zona D: 49-64.

Sódio

O quantitativo de sódio observado nos gráficos pontuou a quantidade de sal existente no leite, apresentando um teor significativo para o elemento, com média geral de 74,0305 mg/L. Comparando-se as 64 amostras para o analito sódio (Figura 6), notou-se que o perfil dos leites das Zonas C e D tenderam a uma característica de leites mais salinos, quando combinado a outro elemento químico, sendo, enfim, um ótimo regulador para recém-nascidos com hiponatremia, auxiliando no tratamento para o quadro clínico.

Figura 6. Concentrações de Na em amostras de leite humano coletadas em um Banco de Leite do estado do Amapá, 2012-2013

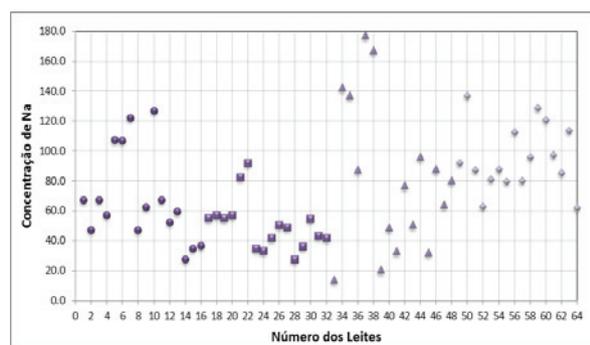


Legenda: Zona A: 1-16; Zona B: 17-32; Zona C: 33-48; Zona D: 49-64.

Cádmio

De um modo geral, as concentrações de cádmio demonstraram um padrão elevado (Figura 7). Entretanto, a absorção de zinco, devido às altas concentrações, pode anular a intoxicação por cádmio. Logo, é importante verificar o excesso de cádmio no leite materno, principalmente, quando se trata da primeira alimentação de um prematuro.

Figura 7. Concentrações de Cd em amostras de leite humano coletadas em um Banco de Leite do estado do Amapá, 2012-2013



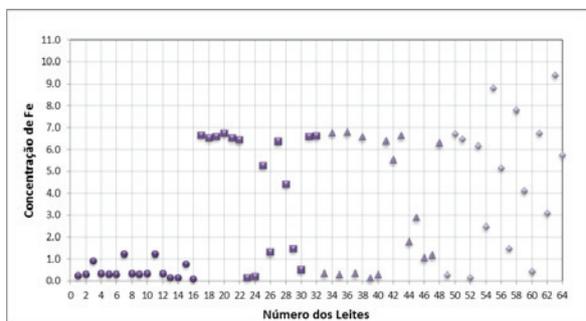
Legenda: Zona A: 1-16; Zona B: 17-32; Zona C: 33-48; Zona D: 49-64.

Ferro

De forma geral, as concentrações de ferro variaram de 0,0731 ppm a 9,4009 ppm (Figura 8). Analisando a média de 3,2432 e o desvio de 2,9947, observa-se um alto valor para o coeficiente de variação, de 92,34%, justamente por fornecer valores aproximados entre a média e o desvio. Entretanto, no trabalho de Donangelo, et al⁸, amostras de leite materno de mães doadoras do Hospital das Clínicas da cidade do Rio de Janeiro forneceram resultados para ferro na faixa de 0,25 a 0,80 mg.L⁻¹, estando inserido dentro dos valores obtidos nesse trabalho. Todavia, comparando-se os valores de Donangelo, et al⁸, e os deste trabalho, observou-se que, para um teste-t, o p-valor apresentado foi de 0,2312, para um α 1% = 0,0709. A análise estatística concluiu que os resultados demonstram variações diferentes das amostras de leite, aceitando-se então uma hipótese alternativa.

No mais, a característica dos leites em estudo demonstraram altos teores para o analito, resultado que poderia contribuir muito no tratamento de RN com anemia profunda, caso fosse diagnosticado a tempo, para melhor eficácia na terapia.

Figura 8. Concentrações de Fe em amostras de leite humano coletadas em um Banco de Leite do estado do Amapá, 2012-2013

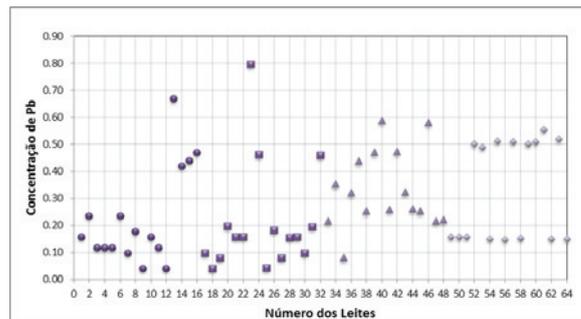


Legenda: Zona A: 1-16; Zona B: 17-32; Zona C: 33-48; Zona D: 49-64.

Chumbo

A média geral para as concentrações de chumbo, relacionando todas as amostras, revelou um valor preocupante de 0,2736 ppm. Trata-se de um teor muito alto, comparando-se com o aceitável pela legislação para Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos, Portaria n. 685⁹, em seu anexo, para leite fluído, pronto para consumo, permite um valor máximo de 0,05 ppm. Ressalta-se que o valor máximo permitido pela OMS¹⁰ é de 0,1 ppm. Apenas os valores mínimos da Zona A e Zona B (Figura 9) estão dentro dos padrões permitidos por essa legislação. Por isso, a investigação de metais em leites humanos é de suma importância, até mesmo para perceber se os teores de certos metais poderiam ser tóxicos para determinados RN com carência em outros nutrientes. Todavia, um excesso de zinco, combinado no mesmo leite, poderia ser absorvido, antagonizando assim a absorção de chumbo. Vale ressaltar que o excesso de chumbo pode causar uma doença chamada saturnismo, ou seja, a intoxicação por chumbo, trazendo transtornos ao ser humano.

Figura 9. Concentrações de Pb em amostras de leite humano coletadas em um Banco de Leite do estado do Amapá, 2012-2013

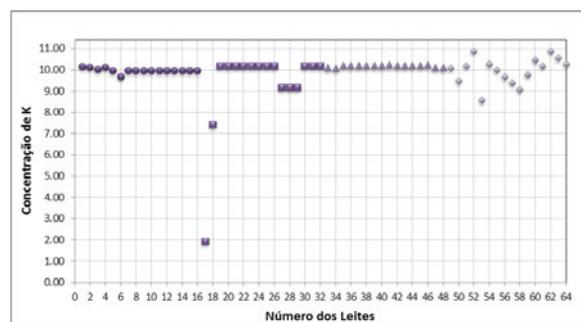


Legenda: Zona A: 1-16; Zona B: 17-32; Zona C: 33-48; Zona D: 49-64.

Potássio

Ao se analisar todos os pontos relativos aos teores de potássio (Figura 10), notou-se a similaridade entre as médias de todas as amostras, pois a média geral foi 9,8499 ppm, mantendo-se no mesmo nível das outras. Observando o coeficiente de variação geral de 11,42%, o baixo desvio de 1,1249, pode-se inserir certa uniformidade, caracterizando um perfil de potássio nas amostras ao entorno de 1,9059 e 10,8735 mg.L⁻¹.

Figura 10. Concentrações de K em amostras de leite humano coletadas em um Banco de Leite do estado do Amapá, 2012-2013



Legenda: Zona A: 1-16; Zona B: 17-32; Zona C: 33-48; Zona D: 49-64.

Outro estudo relacionado foi realizado por Wattiaux¹¹, qual faz um comparativo entre os valores nutricionais de leite de vaca, búfala e humano. Em termos de energia, ele considera o leite de búfala mais calórico. Para lactose, o leite humano está bem acima dos outros comparados. Com relação a minerais e vitaminas, o leite de búfala tem valores próximos aos de vaca, porém com percentuais maiores do que o humano.

Na Tabela 1 verifica-se o comparativo entre os testes realizados com leites comerciais, para calibração do equipamento, podendo-se notar desvios aparentes em virtude da variação dos teores encontrados.

Tabela 1. Comparativa entre os teores do leite comercial e a descrição no seu rótulo

Elemento	Leite comercial (mg.L ⁻¹)	Rótulo da caixa (mg.L ⁻¹)	Desvio
Ca	35,8301	50,00	10,02
Cu	10,2342	Não informado	--
Zn	18,4365	17,00	1,02
Mg	82,3345	75,00	5,19
Mn	0,3367	Não informado	--
Na	145,1761	130,00	10,73
Cd	0,0185	Não informado	--
Fe	1,3692	1,40	0,02
Pb	0,0458	Não informado	--
K	134,8539	213,00	55,26

CONCLUSÕES

A presença de metais nos leites analisados, confirmado pelo método absorção atômica pode

indicar os teores em excesso ou em carência para cada amostra. Os comparativos podem ser feitos tomando como base o padrão de nutrição que cada leite materno deve conter, segundo a OMS¹². No entanto, esse tipo de investigação poderá auxiliar no tratamento a recém-nascidos que necessitem de suplementação alimentar para algum mineral específico.

Com o estudo, verificou-se a importância de se analisar a composição de cada leite, levando em consideração que muitos apresentaram teores tóxicos para metais como cádmio e chumbo, por exemplo, apresentando valores acima do recomendado pela OMS¹².

Enfim, análises minuciosas quanto à quantificação de metais em leites maternos em bancos de leite são eficazes para tratamento terapêuticos a RN, demonstrando a qualidade do leite e o quanto o leite em análise deverá ser suplementado ou até mesmo descartado, em casos de contaminações, por exemplo, evitando futuras doenças e enfermidades no desenvolvimento de um prematuro. Considera-se, também, que o método por absorção atômica além de ser moderno responde com excelente precisão para identificação de metais em gêneros alimentícios, com ampla aceitação na literatura, além de melhorar a qualidade do corpo técnico presente em bancos de leites do país.

REFERÊNCIAS

- Laurindo VM, Calil T, Leone CR, Ramos JL. Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca. *Pediatria*. 1992;14:14-23.
- Farid SM, Enani MA, Wajid SA. Determination of Trace Elements in Cow's Milk in Saudi Arabia. *JKAU Eng Sci*. 2004;15(2):131-40. DOI: <http://dx.doi.org/10.4197/eng.15-2.9>.
- Gonçalves JM, Antunes KCL, Antunes A. Determinação de cálcio e ferro em leite enriquecido. *Quím Nova Escola*. 2001;(14).
- Valsechi OA. Tecnologia de Produtos Agrícolas de Origem Animal. Araras (SP): Centro de Ciências Agrárias – Departamento de Tecnologia Agroindustrial de Socioeconomia Rural; 2001.
- Sokol EJ. Em defesa da amamentação. São Paulo: IBFAN Brasil; 1999.
- Morgano MA, Souza LA, MNeto J, Rondó PHC. Composição mineral do leite materno de bancos de leite. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005 [acesso 27 Jun 2014];25(4):819-24. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000400031&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000400031>.
- Pereira Jr JB, Fernandes KG, Müller RCS, Nóbrega JA, Palheta DC. Determinação Direta de Ca, Mg, Mn e Zn em Amostras de Leite de Búfala da Ilha de Marajó por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS). *Quím Nova*. 2009 [acesso 27 Abr 2014];32(9):2333-5. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000900018&script=sci_arttext. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000900018>.
- Donangelo CM, Trugo MM, Koury JC, Barreto Silva MI, Freitas LA, Feldheim W, Barth C. Iron, zinc, folate and vitamin B12 nutritional status and milk composition of low-income Brazilian mothers. *Eur J Clin Nutr*. 1989;43(4):253-66.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 685, de 27 de agosto de 1998. Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos e seu Anexo: Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos. *DOU*, Brasília, 1998.

10. Chisolm JJ, Chandra RK. Trace elements in the nutrition of children. NNI Workshop Series. 1984;8:157-74.
11. Wattiaux MA. Composição do Leite e seu Valor Nutricional. Universidade do Leite: Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira Internacional / University of Wisconsin-Madison; 2014 [acesso 15 Abr 2014]. Disponível em: <http://www.universidadedoleite.com.br/artigo-composicao-do-leite-e-seu-valor-nutricional>.
12. WHO. World Health Organization. Summary and conclusions. Fifty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Rome;1999. 21 p.