

Deficiência em Micronutrientes em crianças de idade Pré-escolar. Método de Quantificação Laboratorial

Mário Pádua, Sofia Santos e Miguel Brito

Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa

Introdução

A má nutrição conduz geralmente à deficiência em micronutrientes, contribuindo para o aumento dos riscos de morbilidade, mortalidade, estatura reduzida e perturbações cognitivas.

As técnicas laboratoriais que permitem determinar os micronutrientes em estudos epidemiológicos de campo, são em geral dispendiosas e com recurso a metodologias complexas, daí a necessidade de desenvolver metodologias mais rápidas e económicas.

Assim, este estudo tem por objectivo:

- 1- Desenvolvimento de uma metodologia laboratorial para a quantificação simultânea das vitaminas A e E;
- 2- Avaliação dos níveis de deficiência de micronutrientes e de desnutrição nos primeiros 5 anos de vida, numa zona semi-rural de Angola.

Métodos

Local de amostragem

As amostras utilizadas neste projecto foram recolhidas no âmbito de um projecto de investigação desenvolvido no Centro de Investigação em Saúde de Angola (CISA) (Fig 1), localizado numa área semi-rural da Província do Caxito, Angola.

Análises Laboratoriais

As análises laboratoriais foram realizadas nos laboratórios da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.

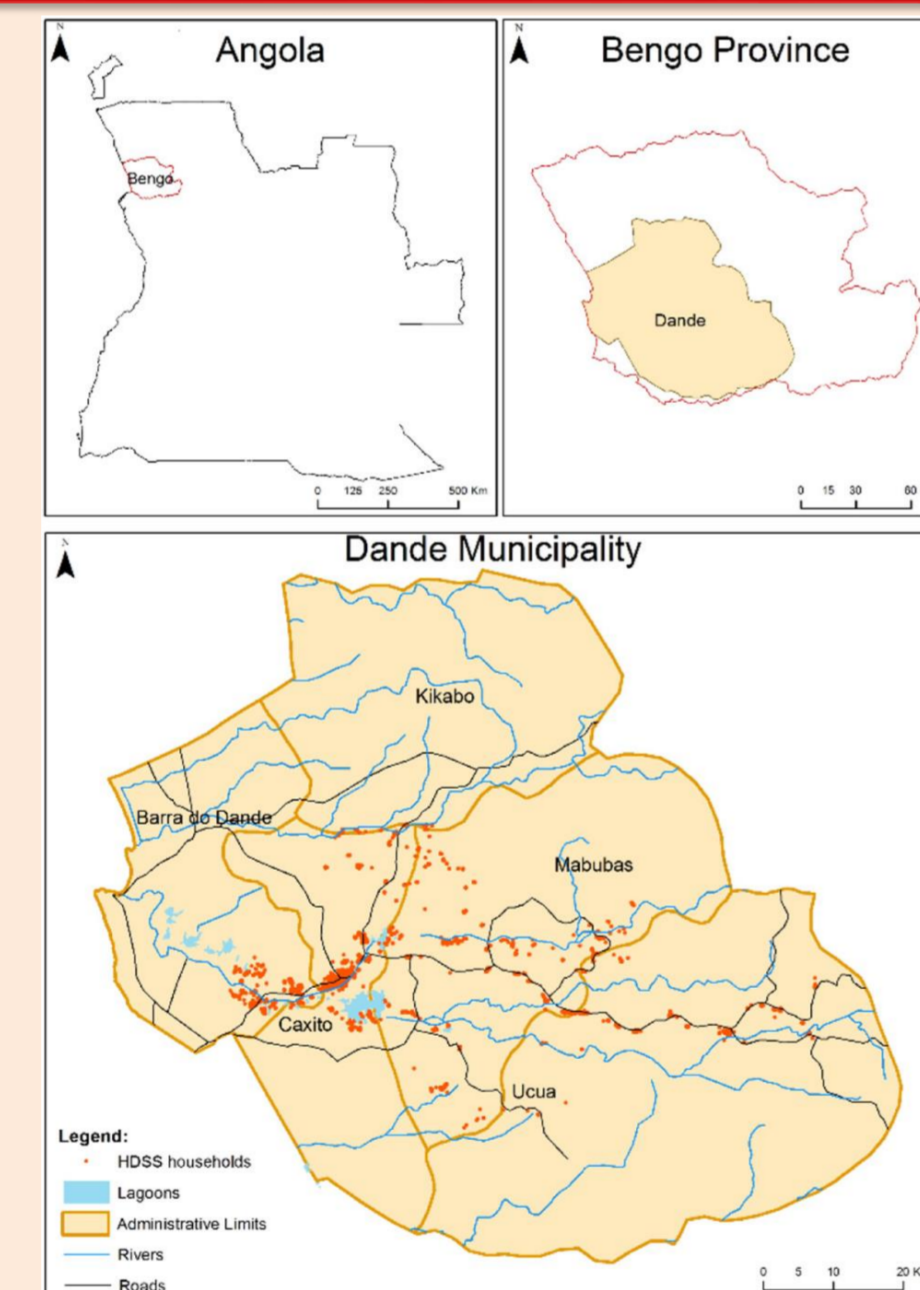


Fig 1. Local de amostragem

Recolha da amostra

Às crianças seleccionadas para participar no estudo, com idades compreendidas entre os 1 e 36 meses, foi recolhida uma amostra de sangue venoso (Fig. 2), bem como os dados antropométricos (peso, altura/estatura) (Fig 3).

Todas as responsáveis legais assinaram consentimento livre e informado.



Fig 2. Recolha de sangue



Fig 3. Avaliação Antropométrica

Métodos (Cont.)

Determinação simultânea de Vitamina A e de Vitamina E

O sangue foi adicionado a um volume igual de metanol contendo o padrão interno (acetato de tocoferol, 10nmol), sendo depois extraído 3x com hexano. Após evaporação do hexano, o resíduo foi dissolvido em metanol.

Os níveis das vitamina A e E foram quantificados em triplicado por HPLC-DAD. A separação foi efetuada numa coluna Phenomenex Luna C18 (5x4.6x150) com deteção a 225 nm para vitamina E e padrão interno e 325 nm para a vitamina A. Volume de injeção foi de 100 µL. O tempo total de análise de cada amostra foi de 23 min usando uma eluição Isocrática (metanol 100%, fluxo de 1 mL/min) e isotérmica (25°C).

Resultados

Validação do método

Tabela 1. Vitamina A. Intra-ensaio e inter-ensaio (n = 5), exatidão e precisão.

LOD = 0.215 nmol ; LLOQ = 0.653 nmol . Resposta = 0,504489VitA-0,0332687 (R² = 0.9989)

Quantidade (nmol)	Quantidade medida (nmol)	SD	Precisão (%RSD)	Exatidão (%)
Intra-ensaio				
0.5	0,529	0,001	0,23	5,9
1.0	1,004	0,003	0,28	0,0
1.5	1,474	0,004	0,27	-1,6
2.0	1,961	0,009	0,46	-2,4
2.5	2,495	0,008	0,30	0,1
3.0	3,037	0,009	0,31	0,9
Inter-ensaio				
0.5	0,536	0,014	2,56	7,2
1.0	0,996	0,014	1,41	-0,4
1.5	1,466	0,022	1,50	-2,3
2.0	1,972	0,023	1,16	-1,4
2.5	2,493	0,010	0,41	-0,3
3.0	3,037	0,011	0,37	1,2

Tabela 2. Vitamina E. Intra-ensaio e inter-ensaio (n = 5), exatidão e precisão.

LOD = 0.065 nmol ; LLOQ = 0.198 nmol, Resposta = 0.30824VitE -0,0206058 (R² = 0.9997)

Quantidade (nmol)	Quantidade medida (nmol)	SD	Precisão (%RSD)	Exatidão (%)
Intra-ensaio				
0.5	0,515	0,008	1,61	1,4
1.0	0,980	0,008	0,87	-1,8
1.5	1,492	0,014	0,92	-0,1
2.0	2,008	0,015	0,74	0,6
2.5	2,512	0,007	0,28	0,3
3.0	2,993	0,005	0,16	-0,5
Inter-ensaio				
0.5	0,502	0,026	5,14	0,4
1.0	0,994	0,019	1,95	-0,6
1.5	1,502	0,024	1,61	0,1
2.0	2,004	0,026	1,32	0,2
2.5	2,503	0,022	0,86	0,1
3.0	2,996	0,019	0,63	-0,1

Resultados (cont.)

O método exibiu elevados níveis de seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão (tabelas 1 e 2). A recuperação de ambas as vitaminas e do padrão interno foi superior a 90%. Linearidade, entre 0,5 e 3,0 nmol, para ambas as vitaminas, tinha R² superior a 0,99.

A aplicação do método às amostras colhidas, permitiu a quantificação simultânea dos níveis séricos Vitamina A e E. Não foram encontradas associações significativas entre os níveis séricos de Vitamina A e E, e o sexo, as classes etárias (apesar de se observar valores mais elevados para as classes mais jovens), nem com os parâmetros antropométricos (tabela3).

Tabela 3 Níveis de vitamina A e E determinados e associação com sexo, e estado nutricional.

		VitA µM				ANOVA	VitE µM			
		N	Média	Minimo	Maximo		N	Média	Minimo	Maximo
Total		225	3,2683	0,84	7,36		197	7,0283	1,19	37,45
Sexo	Rapariga	107	3,33	1,26	7,36	0,348	92	7,08	1,66	27,76
	Rapaz	118	3,21	0,84	6,71		105	6,98	1,19	37,45
Classe etária	0-6m	32	3,17	0,84	7,36	0,268	28	8,24	1,19	27,76
	6-12m	58	3,38	1,67	5,77		49	6,65	1,89	16,24
	12-24m	78	3,37	1,73	5,99		71	7,25	2,17	37,45
	24-36m	57	3,07	0,92	6,71		49	6,39	1,54	19,05
Malnutrição	Não	144	3,3	0,84	7,36	0,597	130	7,33	1,19	27,76
	Severa	79	3,22	1,73	5,99		65	6,56	1,66	37,45
Malnutrição	Não	83	3,32	1,67	7,36	0,592	71	7,5	1,66	37,45
	Crónica	140	3,24	0,84	6,71		124	6,83	1,19	27,05
Baixo	Não	86	3,39	1,67	7,36	0,17	75	7,5	1,89	27,76
	Peso	137	3,2	0,84	6,71		120	6,81	1,19	37,45

Conclusão

Foi possível o desenvolvimento metodológico de um método laboratorial para deteção simultânea de Vitamina A e E, em pequenas amostras de soro, recolhidas em trabalho de campo.

Os dados obtidos mostraram que a Vitamina A não parece apresentar deficiências populacionais graves, no entanto para a Vitamina E os níveis de défice detectados deverão ser analisados num projecto mais vasto.

Agradecimentos

Queremos expressar a nossa gratidão a todas as crianças e mães que aceitaram participar neste projecto. Agradecemos ainda á equipa do Centro de investigação em Saúde de Angola (CISA) pelo apoio prestado neste projecto, nomeadamente à Dra. Ânia Soares e à Dra. Cláudia Fançony. Este projecto foi financiado no âmbito do IDI&CA2016-projeto IPL/2016/MicroNut_ESTeSL