

JENYFFER MEDEIROS CAMPOS

PERFIL DOS NÍVEIS DE VITAMINAS A e E EM LEITES DE
DOADORAS PRIMÍPARAS E MULTÍPARAS EM BANCOS
DE LEITE HUMANO

Recife, 2005

JENYFFER MEDEIROS CAMPOS

PERFIL DOS NÍVEIS DE VITAMINAS A e E EM LEITES DE
DOADORAS PRIMÍPARAS E MULTÍPARAS EM BANCOS
DE LEITE HUMANO

Dissertação apresentada ao
Colegiado do Programa de Pós-
graduação em Nutrição do Centro
de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do grau
de Mestre em Nutrição

Mestranda: Jenyffer Medeiros Campos

Orientador: José Almiro da Paixão

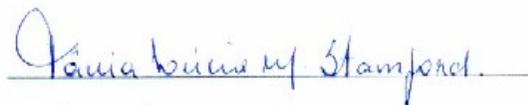
Recife, 2005

Título: “Perfil dos níveis de vitaminas A e E em leite de doadoras primíparas e múltiparas em bancos de leite humano”

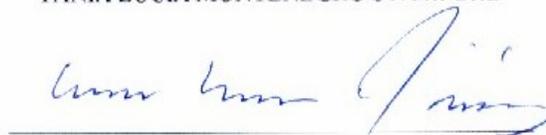
Mestranda: Jenyffer Medeiros Campos

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 02/03/05

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA



TÂNIA LÚCIA MONTENEGRO STAMFORD



ALCIDES DA SILVA DINIZ



LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO COELHO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado embora eu não merecesse...

À Luanna, minha filha, que foi o melhor presente que Deus poderia ter me dado... e ainda veio de brinde no Mestrado...

Aos meus pais, em especial à minha mãe, Jane, que desde pequena me educaram e traçaram um futuro com honestidade e respeito. Serei eternamente grata.

A Cândido, meu esposo, que me apoiou nesta longa trajetória, me incentivando e compartilhando dos períodos de estresse...

A Almiro, que me incentivou no caminho da pesquisa desde a iniciação científica e esteve sempre ao meu lado. Mais do que me orientar, sacrificou seus finais de semana e a paciência para orientar uma aluna meio no mundo da lua...

À Fátima Mendonça, Enfermeira chefe do Banco de Leite do Hospital das Clínicas, pela dedicação inigualável ao aleitamento materno. Parabéns.

À Nazaré, que coletou boa parte das minhas amostras, me ajudando incondicionalmente...

Às minhas amigas do Mestrado, Izabele, Chika, Geíza e Tábata, valeu a pena as brigas e alegrias que passamos juntas. Izabele, minha fiel amiga e parceira...

À Michelle Carvalho, minha eterna amiga. Faltam adjetivos para descrever você. Amiga, estudiosa, sensível e agora “gaúcha”. Boa sorte na sua nova jornada.

À Wasti, minha chefe, que sempre me apoiou nesta jornada e compartilhou das minhas conquistas...

À Andréa Carla, que sempre me estimulou e incentivou a seguir a vida acadêmica, me cobrando mais empenho no mestrado...

Aos amigos da CDP, Adriana, Fátima, Alessandra, obrigada por fazerem a minha vida mais engraçada... (pipipi)

À Ingrid, minha irmã, que ficou com Luanna nos finais de semana, mesmo que às vezes sem querer..., quando precisei estudar.

Aos amigos do LEAAL, Camilo, Arthur, Alexandre, obrigada pela ajuda e orientações nas práticas e solução de problemas de laboratório...

À Tânia Stamford, Neci, obrigada pela atenção e cobrança no andamento do meu mestrado.

E a todos que não citei, mas que compartilharam desta conquista, um muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1. Importância Nutricional das Vitaminas	9
2.1.1. Vitamina A	9
2.1.2. Vitamina E	10
2.2. Importância do Leite Materno	12
2.3. Variação da composição do leite materno	14
2.4. Efeito do estado nutricional materno na resposta na gravidez e lactação	17
2.5. Situação atual das gestantes no Brasil	18
2.6. Necessidades nutricionais do lactente	20
2.7. Métodos de manipulação da composição vitamínica do leite e seus efeitos	22
2.8. Métodos de análise de vitaminas	23
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Sujeitos	28
4.2. Seleção e caracterização da amostra	29
4.3. Procedimento de extração das vitaminas	29
4.4. Condições cromatográficas	30
4.5. Equipamento	30

4.6. Sistema de quantificação	30
4.7. Análise estatística	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Perfil sócio-econômico das doadoras	32
5.2. Mensuração de vitaminas nos leites de diferentes fases	35
5.3. Efeito da alimentação sobre os níveis de vitaminas A e E no leite humano	42
5.4. Adequação nutricional do leite materno	48
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8. ANEXOS	66

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELAS

	Página
Valores de calorias e vitaminas lipossolúveis nos leites materno e de vaca	16
Percentual de nascidos vivos por faixa etária materna no parto	19
Necessidades nutricionais para crianças de 0-1 ano	21
Perfil das mães estudadas (N=18)	32
Características das mães estratificadas segundo o grau de paridade	33
Concentrações de vitaminas A e E segundo grau de paridade	37
Níveis de retinol ($\mu\text{g}/\text{dL}$) em várias amostras de leites em distintas fases	39
Níveis de tocoferol ($\mu\text{g}/\text{dL}$) em várias amostras de leites em distintas fases	40
Razão de Absorvância entre λ máximo e λ fixo e tempo de retenção ajustado (tR') em padrões e amostras de leite humano	42

FIGURAS

Perfil das doadoras de acordo com o número de gestações prévias	34
Níveis de retinol e tocoferol em leites de distintas fases	35
Comportamento do declínio dos níveis de vitaminas no período inicial de lactação	36
Frequência de consumo de fígado e vísceras	44
Frequência de consumo de leite, queijo, ovo	44
Frequência de consumo de carne bovina, aves e peixes	45
Frequência de consumo de cenoura, pimentão e abóbora	45
Frequência de consumo de margarina, manteiga e óleo	45

RESUMO

O leite humano muda a sua composição ao longo da lactação, enquanto aumenta o teor de lipídeos decresce o de vitaminas lipossolúveis, se diferenciando basicamente em três fases distintas: colostro, transição e maduro. O desenvolvimento fisiológico da mãe e sua alimentação comprometem a composição e a qualidade do leite, desta forma, estratificou-se as mães em primíparas e multíparas. Este trabalho teve como objetivo de mensurar as variações de vitaminas A e E no leite de diferentes fases, bem como avaliar a influência da dieta nos níveis destas vitaminas e sua adequação nutricional à dieta do lactente. Tomou-se amostras de leite humano de mães primíparas (n=9) e multíparas (n=9), doadoras dos Bancos de leite humano do Recife. Foi levantado inquérito alimentar das mães previamente selecionadas. A extração das vitaminas A (retinol-trans) e E (α -tocoferol) foram obtidas por extração líquido-líquido, após saponificação metanólica, conforme método proposto por Paixão & Stamford (2002); Paixão & Campos, (2003). A quantificação das vitaminas foi obtida por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) em uma corrida cromatográfica de 8.5 minutos, eluídas em metanol, numa coluna ODS-II, 150 mm x 3,2 mm, ϕ 5 μ m, lidas em seus máximos de absorção de 325nm, até 5 min, 292nm, de 5.01 a 8.5 min, respectivamente. As multíparas apresentaram níveis de retinol ($334\pm 142\mu\text{g/dL}$, $208\pm 122\mu\text{g/dL}$, $116\pm 38\mu\text{g/dL}$) superiores aos da primíparas ($179\pm 57\mu\text{g/dL}$, $109\pm 64\mu\text{g/dL}$, $89\pm 18\mu\text{g/dL}$) para colostro, transição e maduro, respectivamente, diferindo significativamente ($p \leq 0,001$) entre fases. As multíparas diferiram menos, nos níveis de tocoferol, nas fases colostro ($1335\pm 906\mu\text{g/dL}$) e transição ($367\pm 98\mu\text{g/dL}$), enquanto no maduro ($412\pm 82\mu\text{g/dL}$) foi ligeiramente superior, inclusive de modo significante ($p \leq 0,001$). Ao longo da lactação no período avaliado, o percentual de redução entre as fases, colostro e transição, e colostro e maduro foi mais acentuado para o tocoferol, superiores a 60% em ambos os grupos. A redução mais expressiva de retinol foi obtida entre o leite colostro e maduro (~50%). Na avaliação do inquérito alimentar, observou-se o baixo consumo de alimentos ricos em vitamina A, principalmente nas primíparas, e elevado consumo de alimentos ricos em vitamina E em ambos grupos. Existem diferenças nos níveis de retinol e tocoferol entre leite materno de primíparas e multíparas, nas distintas fases. Do leite colostro a maduro, observou-se uma redução nos teores bem como em variabilidade, justificando diferenças no material biológico e tendendo a estabilização no leite maduro.

Palavras-chave: leite humano, retinol, tocoferol, *HPLC*.

ABSTRACT

The main change in composition of milk, involve increase lipids content and respective decrease fat soluble vitamins, along lactation that differentiate itself in three distinct phases: colostrum, transition and mature milk. The development physiological and nutritional status of mothers may affect composition and quality of milk, therefore classified groups as primiparous and multiparous. The main objective was quantified the vitamins levels A and E in the different phases and your relation between groups, verify influence of dietary habits on composition of these vitamins and adequacy dietary to requirements of infant. Samples of milk of diferents phases (colostrum, transition and mature) was took from primiparous (n=9) and multiparous (n=9) mothers attending by Human Milk Bank of Recife. The extraction procedure of A and E vitamins was liquid liquid extraction after methanolic saponification described by Paixão & Stamford, (2002), Paixão & Campos, (2003). The quantification of A and E vitamins were carried out by HPLC (High Performance Liquid Chromatography), using methanol as mobile phase, column ODS-II, 150mm x 3,2mm, ϕ 5 μ m, as stationary phase. The A and E vitamins were detected in maximum of absorption, 325 nm until 5 min and 292 nm from 5.01min until 8.5 min. Multiparous groups showed retinol ($334\pm 142\mu\text{g/dL}$, $208\pm 122\mu\text{g/dL}$, $116\pm 38\mu\text{g/dL}$) levels superior to the of primiparous ($179\pm 57\mu\text{g/dL}$, $109\pm 64\mu\text{g/dL}$, $89\pm 18\mu\text{g/dL}$) to colostrum, transition and in mature milk, statistically different between phases ($p \leq 0,001$). Tocopherol levels were less different in the distinct phases, mainly between colostrum ($1335\pm 906\mu\text{g/dL}$) and transition ($367\pm 98\mu\text{g/dL}$), while, to mature milk ($412\pm 82\mu\text{g/dL}$) was superior and significant ($p \leq 0,001$). Along lactation, accentuated reduction occurred to tocopherol levels, when passing from colostrum to transition, equally primiparous and multiparous groups, superior to 60%. The reduction observed to retinol levels between phases lactation was superior when compared phase colostrum and mature (~50 %). Habits dietary revealed that low frequency of consume of foods source A vitamin, mainly, to primiparous groups, and high frequency of consume of food source E vitamins, in both, are according the results showed. There are differences in retinol and tocopherol levels between primiparous and multiparous, and phase of lactation. The human milk tends to decrease vitamins levels, from colostrum until mature stage, include decreased intrinsic variations, justifying difference between biological material, stabilizing in the mature milk.

Key-words: human milk, retinol, tocopherol, *HPLC*.

1. INTRODUÇÃO

A vitamina A é um micronutriente essencial envolvido na reprodução, na preservação e desenvolvimento fetal, integridade do sistema imunológico e manutenção do tecido epitelial (Dimenstein *et al*, 2003). Pertence ao grupo dos retinóides e tem a habilidade de regular o crescimento das células e promover a diferenciação celular em culturas celulares e em modelos animais. Reciprocamente, em diversos modelos de carcinogêneses, uma deficiência de vitamina A está relacionada com a promoção de desenvolvimento de tumores (Chen; Ross, 2004).

A vitamina E é o termo genérico usado para definir compostos tocóis e tocotrienóis com atividade biológica diferenciada em relação ao alfa-tocoferol (Miquel, 2004). A vitamina E tem função de proteção celular contra doenças degenerativas, com propriedades anticarcinogênicas e antiateroscleróticas (Eldin *et al*, 2000; Vega-López *et al*, 2004) e prevenção na formação de radicais livres inibindo a oxidação (Escrivá *et al*, 2002; Miquel, 2004). Em adição às funções antioxidantes, o alfa tocoferol modula células na sinalização e transcrição de diversos genes (Vega-López *et al*, 2004).

Carotenóides e tocoferóis são conhecidos como agentes antioxidantes por reagirem com o oxigênio e suas formas anômalas (radicais livres). Entretanto, tocoferóis são menos sequestrantes do que os carotenóides. Ambas as vitaminas podem agir fisicamente diversas vezes sem serem destruídos, porém quimicamente isto não ocorre (Havemose *et al*, 2004).

Por serem antioxidantes em potencial, estas vitaminas podem prevenir a redução da performance de memória associada ao avanço da idade e função cognitiva. Esta suposição é confirmada por dados experimentais e clínicos retardando desordens cognitivas como demência vascular e o Mal de Alzheimer (Wolters *et al*, 2004).

Durante a gestação, as necessidades de vitamina A e E são aumentadas e é comum em muitos países as mulheres apresentam freqüentemente sintomas de deficiência (Lambert; Scott, 1996), geralmente persistindo até o período inicial do aleitamento (OMS, 2001). Por não serem sintetizadas no organismo, precisam ser ingeridas via dieta, sendo necessárias em microquantidades (Paixão; Stamford, 2004).

O alimento ideal para o lactente é o leite materno, que contém fatores biológicos envolvidos na regulação do crescimento do recém nascido, incluindo desenvolvimento cerebral (Gazzolo *et al*, 2004). O leite humano é um fluido biológico complexo e específico para cada espécie, adaptado ao longo da existência humana para satisfazer perfeitamente as necessidades nutricionais e imunológicas da criança (Nascimento; Issler, 2003). É a mais importante, e não obstante, a única fonte de vitamina A para o bebê (Strobel; Heinrich; Biesalski, 2000).

A lactação progride por três estágios distintos, de 0 a 30 dias após o nascimento, bem identificados como colostro, transição e maduro. O colostro é um fluido amarelado secretado nos últimos dias de gestação e nos primeiros dias após o nascimento, com alta densidade e pouco volume (Uruapka; Ismond; Akodundu, 2002; Nascimento; Issler, 2003) variando de 2 a 10mL por mamada. Possui alta concentração de proteínas e

minerais, com baixa concentração de gordura e lactose, refletindo as necessidades do recém-nascido durante a primeira semana de vida (Nascimento; Issler, 2003).

Durante o período inicial de amamentação, a composição do leite humano sofre alterações rápidas, principalmente na redução do teor protéico e de minerais e no aumento de gorduras e lactose. Do 7º ao 21º dia pós-parto, as alterações na composição láctea continuam ocorrendo, embora mais lentamente, quando o leite passa a receber a denominação de “leite de transição”. Em torno do 21º dia, a composição do leite torna-se relativamente mais estável, passando a ser caracterizado como leite maduro (Euclides, 1997).

A história obstétrica de uma mulher é expressa em termos de quantidade e ordenação das gestações, ou seu estado gravídico. Os termos primípara e multípara são utilizados para representar nenhuma gravidez anterior e várias gestações, respectivamente (Williams,1997). Em alguns mamíferos, o número de partos está diretamente relacionado com o aumento dos níveis de beta-caroteno e de vitamina E no colostro. As possíveis razões do aumento dos níveis de beta-caroteno no leite são explicadas pelo aumento da absorção do caroteno e/ou redução da conversão à vitamina A, bem como a mobilização dos tecidos de estoque (Schweigert; Gottwald, 1999; Schweigert *et al* 2004).

Poucos trabalhos reportam os níveis de vitaminas A e E nas diferentes fases do leite materno, principalmente no Brasil. É pertinente o interesse de mensurar a variação nos níveis destas vitaminas no leite materno bem como analisar a sua adequação à dieta do lactente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância Nutricional das Vitaminas

2.1.1. Vitamina A

Vitamina A é o termo genérico usado para descrever todos os retinóides que têm atividade biológica de trans-retinol. A vitamina A natural ocorre na forma de ésteres de retinila de cadeia longa (acetato e palmitato de retinila), tendo suas formas metabolicamente ativas os seus correspondentes aldeído (retinal) e ácido (ácido retinóico). Já os carotenóides são convertidos em vitamina A, com diferentes graus de eficiência, sendo o β -caroteno o que apresenta maior atividade biológica (Mahan; Escott-Stump, 2002).

Os retinóides e carotenóides são compostos apolares e geralmente se encontram associados aos lipídios, órgãos específicos ou proteínas de transporte, tanto nos alimentos como em células vivas. No leite, o retinol se encontra associado com as gotículas de gordura ou em micelas dispersas no meio aquoso (Fennema, 2000; Schweigert *et al*, 2004).

O ácido retinóico atua como um fator de crescimento e diferenciação em muitos tecidos. Presente no plasma em concentrações de nanogramas, a principal das ações biológicas do ácido retinóico é habilitar os receptores de retinóides na ativação da transcrição de uma grande variedade de genes (Chen; Ross, 2004).

Além das funções já descritas que o retinol possui, a vitamina A desempenha papel fundamental na visão, pois é um dos componentes dos pigmentos visuais e essencial para a integridade da fotorrecepção nos cones e bastonetes na retina (Mahan; Escott-Stump, 2002).

Nos animais, tanto a carência severa quanto o excesso de vitamina A têm efeitos teratogênicos e são associados a resultados desfavoráveis na gestação (OMS, 2001). A deficiência de vitamina A altera a queratinização das membranas mucosas que reveste o trato respiratório, o canal alimentar e o trato urinário. Uma deficiência prolongada desta vitamina pode produzir alterações na pele, cegueira noturna e xerofthalmia. Outros sintomas de deficiência da vitamina A são perda de apetite, inibição do crescimento, anormalidades ósseas, queratinização das papilas gustativas e perda do paladar (Euclides, 1997; OMS, 2001; Mahan; Escott-Stump, 2002).

Além destas funções, diversos estudos têm mostrado que a suplementação de vitamina A reduz significativamente a mortalidade relacionada ao sarampo e a severidade desta doença, pois os níveis plasmáticos desta vitamina reduzem em infecções agudas como sarampo, malária, tuberculose entre outras doenças (Enwonwu; Phillips, 2004).

2.1.2. Vitamina E

A vitamina E é normalmente denominada tocoferol e sua atividade no organismo é desempenhada pelo alfa, beta, gama e delta-tocoferol e os tocotrienóis, seus precursores naturais (Fennema, 2000; Mahan; Escott-Stump, 2002).

A forma principal da vitamina E é o alfa-tocoferol que funciona como o composto lipossolúvel de maior atividade antioxidante de lipoproteínas em tecidos mamários e plasma, envolvida na síntese de prostaglandinas e na inibição da agregação plaquetária (Debier *et al*, 2002).

Em alimentos, outras funções fisiológicas têm sido atribuída à vitamina E, agindo na prevenção da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados. À nível celular, protege as lipoproteínas e as membranas celular e sub-celular da deterioração por catalisação de radicais livres, resultando na diminuição da integridade da membrana e comprometendo a função celular (Mahan; Escott-Stump, 2002; Yang *et al*, 2004). Esta função implica no desenvolvimento da patogênese de diversas doenças como câncer e doenças inflamatórias (Debier *et al*, 2002).

A localização da vitamina E dentro da membrana, formando um complexo com ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios, mostra que a vitamina E pode evitar o desencadeamento das reações de peroxidação lipídica geradas pelos radicais livres, particularmente em membranas ricas em lipídios poliinsaturados (Emekli *et al*, 2004).

A mais importante função para o recém-nascido é a sua ação como antioxidante natural (Euclides, 1997) no desenvolvimento do sistema imune bem como na manutenção do mesmo (Debier *et al*, 2002).

Yamauchi *et al* (2005) relata que, contrariamente ao conceito estabelecido na literatura, o alfa-tocoferol tem falhado na proteção contra doenças cardiovasculares em

humanos. Por ser considerado o mais abundante e biologicamente ativo antiaterogênico, inibindo a oxidação do LDL-colesterol (*Low Density Lipoprotein*), pode atuar como pró-oxidante, em um processo conhecido como peroxidação mediada pelo tocoferol. Desta forma, ocorre a formação de radicais alfa-tocoferoxil que atuam na oxidação do LDL-colesterol.

As propriedades da vitamina E de aliviar ou prevenir doenças respiratórias fibrocística, febre reumática, distrofia, toxemias em gravidez, aborto espontâneo e esterilidade ainda não estão bem esclarecidas (Mahan; Escott-Stump, 2002).

Em alguns mamíferos, como as vacas, baixas concentrações plasmáticas de alfa-tocoferol no parto é considerado como um significativo fator de risco para infecção intramamária e mastite durante a primeira semana de lactação (Chawla; Kaur, 2004).

2.2. Importância do Leite Materno

O leite humano de mães saudáveis é a forma mais segura e preferida de alimentação para o recém-nascido. Contém uma única combinação de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, enzimas e células vivas já conhecidas, que conduzem a benefícios imunológicos, fisiológicos e econômicos (Nascimento; Issler, 2003).

O leite materno não apenas fornece ao recém-nascido os nutrientes necessários, como também, proporciona importante proteção contra infecções. Além disso, ocorre secreção de vários tipos diferentes de leucócitos, incluindo neutrófilos e macrófagos,

alguns dos quais são particularmente letais para bactérias que de outro modo, poderiam causar infecções fatais em recém-nascido (Guyton; Hall, 2002).

Grande parte das mortes e problemas de saúde que a criança enfrenta no primeiro ano de vida está relacionada à alimentação. O desmame precoce, a introdução de alimentos complementares ou qualquer substituto do leite materno antes do quarto mês de vida da criança, além das práticas inadequadas de alimentação aumentam o risco de morbi-mortalidade (Euclides, 1997; Borges; Philippi, 2003). A diminuição dos níveis de vitamina A em crianças é principalmente devido à ausência de aleitamento materno nos seis primeiros meses de vida, seja aleitamento exclusivo ou complementado, sendo a principal causa de cegueira permanente acompanhada de morte nos países em desenvolvimento (Dimenstein *et al*, 2003).

O recém-nascido quando amamentado ao seio, o sistema digestivo está devidamente preparado para receber e utilizar o leite materno. Por outro lado, quando a criança nasce prematuramente, ou recebe outro tipo de alimento diferente do leite materno, freqüentemente apresenta limitações ou dificuldades em graus variáveis, dependendo do grau de imaturidade e de adequação ou inadequação da alimentação (Euclides, 1997).

Quando se utiliza o leite de vaca para alimentar o lactente no lugar do leite materno, os anticorpos presentes no leite de vaca costumam ter pouca importância, pois são normalmente destruídos dentro de poucos minutos no ambiente interno do recém-nascido (Guyton; Hall, 2002). Além disso, a composição do leite materno é adequada

para fornecer energia e nutrientes necessários nas quantidades adequadas e promover o vínculo mãe-filho (Mahan; Escott-Stump, 2002).

A *World Health Organization* (WHO) recomenda a prática do aleitamento materno exclusivamente por seis meses e a manutenção do aleitamento materno acrescido de alimentos complementares até dois anos de vida ou mais (OMS, 2001).

2.3 Variação da composição do leite materno

Mudanças na composição dos solutos do leite são um mecanismo de relativas atividades de síntese e transporte que ocorrem na glândula mamária. Durante a fase inicial de secreção do leite materno, em torno de 24hs pós-parto, os níveis de sódio e cloro diminuem enquanto a concentração de glicose no leite aumenta. Há um bloqueio feito pela célula epitelial do lúmen do alvéolo para o plasma, impedindo a passagem da glicose, permitindo a passagem do sódio e potássio do lúmen para o espaço intersticial (Mcmanaman; Neville, 2003).

Durante as primeiras 48 horas após o nascimento, na secreção do colostro, há um aumento nos níveis de lactoferrina e imunoglobulina A. Esta, protege contra infecções enquanto a lactoferrina desempenha um papel no transporte de ferro e como bacteriostático/bactericida (Jackson *et al*, 2004). A concentração destas importantes proteínas protetoras permanece alta, compondo mais de 10% do leite, quando então caem rapidamente depois do segundo dia. Isto ocorre devido ao aumento do volume de secreção de leite com conseqüente diluição dos mesmos (Mcmanaman; Neville, 2003).

A coloração amarelada do colostro está associada ao seu elevado conteúdo de carotenóides, incluindo o α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina (Schweigert *et al*, 2004). Ele contém também proteínas e minerais, principalmente sódio, potássio, cloro e zinco e menos gorduras e carboidratos do que o leite maduro. O alto teor de anticorpos facilita o crescimento de *Lactobacillus bifidus* no trato gastrointestinal e ajuda na eliminação do mecônio (Nascimento; Issler, 2003). O colostro permanece em média até o 4º ou 7º dia pós-parto.

Em torno de 72 horas pós-parto, há um aumento expressivo do volume de leite concomitante com as taxas de síntese e/ou secreção da maioria dos componentes do leite maduro, incluindo, mas não limitado, para lactose, proteínas (principalmente caseína), lipídios, cálcio, sódio, magnésio, potássio, citrato, glicose e fosfatos livres (Nascimento; Issler, 2003).

Alguns autores relatam de fase inicial do leite de transição entre o 7º e 10º dia pós-parto até o 25º dia. Nesta fase, ocorre decréscimo na concentração de imunoglobulinas e proteínas e aumento nos níveis de lactose, gordura e no valor energético até obtenção de características de leite maduro (Nascimento; Issler, 2003).

O leite maduro é uma mistura heterogênea consistindo de três frações: emulsão de glóbulos de gordura, suspensão de micelas de caseína e solução de componentes hidrossolúveis (Nascimento; Issler, 2003). O leite inicial, chamado anterior, contém menos gordura e o restante, leite posterior, que dura até o final da lactação, é quatro vezes mais gorduroso que o anterior (Pons *et al*, 2000).

Os lipídios no leite humano representam a maior fonte de energia para o crescimento do bebê, além de excelentes reservas de vitaminas (Allen *et al*, 2001), e que suprem as necessidades essenciais de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos poliinsaturados (Koletzko *et al*, 2001).

Variações de componentes nutricionais do leite humano dependem do estágio de lactação, período de alimentação, nutrição materna, idade da mãe, idade gestacional da criança, e outros aspectos individuais e seletivos da lactante (Nascimento; Issler, 2003).

Os níveis de vitamina A e α -tocoferol são em geral maiores no colostro e declinam significativamente durante as primeiras semanas de lactação, variando com o estágio, com tendência decrescente até o fim da lactação (Bathe *et al*, 1999; Macias; Schweigert, 2001; Debier *et al*, 2002; Schweigert *et al*, 2004). Na tabela 1 pode-se observar o declínio das vitaminas lipossolúveis ao longo da lactação.

Tabela 1 – Valores de calorias e vitaminas lipossolúveis nos leites materno e de vaca

Composição do leite em 100mL	Colostro	Transição	Maduro	Vaca
Valor energético (Kcal)	57,0	63,0	65,0	65,0
Vitamina A (μ g)	151,0	88,0	75,0	41,0
Vitamina D (UI)	-	-	5,0	2,5
Vitamina E (mg)	1,5	0,9	0,25	0,07
Vitamina K (μ g)	-	-	1,5	6,0

Fonte: Williams, 1997.

No Brasil, há poucos estudos que reportam as diferenças vitamínicas nas três fases de lactação, especialmente no Nordeste. Os mais frequentes trabalhos encontrados

na literatura se referem à outras espécies, como focas, vacas e éguas (Debier *et al*, 2002; Mendonça *et al*, 2002; Schweigert; Gottwald, 1999), cuja variação pode atingir entre colostro e maduro.

2.4. Efeito do estado nutricional materno na gravidez e lactação

Todas as vitaminas são fornecidas no leite materno, mas suas concentrações variam marcadamente de modo individual. A idade materna, a constituição física, o estado nutricional, os antecedentes patológicos individuais e hereditários, as condições genéticas, o contexto sócio-econômico e outras condições influenciam o curso e o resultado da gravidez e suas etapas sequenciais (Low; Batista Filho; Souza, 2001; Olafsdottir *et al*, 2001) podendo afetar a produção de leite (Theil; Jorgensen; Jakobsen, 2004) e a conseqüente transmissão de nutrientes e outros compostos de interesse nutricional.

Maiores quantidades de vitaminas A, C, D, E, K, ácido fólico e outras vitaminas do complexo B são necessárias durante a gravidez (Martinez; Ortega, Andres, 1997) e com freqüência, ocorre deficiência de cálcio, fosfato, ferro e vitaminas (Guyton; Hall, 2002). Estudos realizados com animais e humanos confirmam que o estado nutricional materno é determinante direto do crescimento intra-uterino. A boa nutrição da mãe é fundamental para assegurar a nutrição e o perfeito crescimento e desenvolvimento do filho (Euclides, 1997).

Se os elementos nutritivos apropriados não estiverem presentes na dieta da mulher grávida, podem surgir várias deficiências maternas. É também particularmente importante a adição de vitamina D e vitamina A, para prevenção de más formações ósseas e hemorragia cerebral causada pelo processo de nascimento, respectivamente (Guyton; Hall, 2002).

O estado nutricional materno durante a gravidez influencia na quantidade de vitamina A produzida no leite materno (Martinez; Ortega, Andres, 1997). Estudos recentes indicam que a quantidade de vitamina A no leite materno está diretamente relacionada com a dieta materna e menos controlada homeostaticamente (Strobel; Heinrich; Biesalski, 2000). Uma alimentação que assegure um aporte adequado de vitamina A é a maneira de responder às necessidades durante a gravidez e o período de amamentação (OMS, 2001).

2.5 Situação atual das gestantes no Brasil

De acordo com o último censo realizado no Brasil, a faixa etária das mães de maior percentual de nascimentos de crianças é entre 20 e 24 anos, representando cerca de 31%. No Nordeste, este percentual chega a 33%. Nesta região, também se observa que o segundo maior número de nascidos vivos compreende de 15 a 19 anos, sendo superior às idades de 25 a 29 anos, como mostra a tabela 2.

Tabela 2- Percentual de nascidos vivos por faixa etária materna no parto

Local	Idade da mãe na ocasião do parto					
	<15 anos	15-19 anos	20-24 anos	25-29 anos	30-34 anos	35-39 anos
Brasil	0,7	20,7	30,6	23,3	14,7	7,0
Nordeste	0,8	22,8	32,6	21,7	12,5	6,2
Pernambuco	0,7	21,9	32,7	23,1	12,8	6,1
RMR *	0,6	21,8	33,0	24,4	12,8	5,3
Recife	0,5	20,2	31,0	25,4	14,6	6,3

Fonte: IBGE, 2000.

* RMR- Região Metropolitana do Recife

Os dados do Nordeste representam uma realidade já bem registrada, pois é crescente o número de casos de mulheres que têm filhos precocemente (Low; Batista Filho; Souza, 2001). É um dado preocupante desde que gestações em qualquer extremo etário do ciclo reprodutivo trazem problemas específicos. Uma gravidez na adolescência traz vários riscos sociais e nutricionais, pois as demandas nutricionais são impostas a um organismo em crescimento (Williams,1997).

Mundialmente, o consumo de vitaminas e minerais por adolescentes é bastante deficiente, principalmente as vitaminas lipossolúveis e os minerais cálcio, ferro e zinco, principalmente nas mulheres (Paradowska; Trafalska; Grzybowski, 2000). A mãe adolescente tem que acrescentar suas próprias necessidades de crescimento às demais necessidades impostas pela gravidez. Além disso, o número de gestações e os intervalos entre partos (ou gestações) influenciam enormemente as reservas nutricionais maternas influenciando por último na gravidez (Williams,1997). Porém, a suposição de que as adolescentes grávidas precisam de um suplemento de nutrientes para suportar o seu próprio crescimento tem sido questionada (Mahan; Escott-Stump, 2002).

2.6 Necessidades nutricionais do lactente

O requerimento de vitamina A do lactente têm sido estimado com base na composição do leite materno e no volume diário médio do leite ingerido, que gira em torno de 750mL. Entretanto, no auge da lactação (2º e 3º mês) a mãe pode produzir diariamente 1500mL de leite (Guyton; Hall, 2002).

A reserva de vitamina A do recém-nascido é variável em função do estado nutricional e da idade gestacional da mãe, e dependendo da alimentação, essa reserva pode aumentar rapidamente no período neonatal (Euclides, 1997). Além disso, vitaminas e outros nutrientes são repassados ao bebê exclusivamente via leite materno (OMS, 2001).

Não existem evidências de que a deficiência de tocoferol possa se desenvolver em lactentes. Porém, deve-se suspeitar da deficiência nos lactentes com má absorção de gordura. A deficiência de vitamina E em prematuros pode causar várias doenças como: anemia hemolítica, retinopatia, displasia broncopulmonar, hemorragia paraventricular e intraventricular, desordens neurológicas e anormalidade da função plaquetária (Euclides, 1997). Na tabela 3 estão ilustrados os níveis médios de vitaminas lipossolúveis necessárias ao crescimento da criança.

Tabela 3- Necessidade nutricionais para crianças de 0-1 ano.

Vitaminas lipossolúveis	0 – 6 meses	7 meses - 12 meses
Vitamina A (µgRE, retinol equivalente)	375	400
Vitamina D (µg)	5	5
Vitamina E (mg)	2,7	2,7
Vitamina K (µg)	5	10

Fonte: WHO (2002)

No recém-nascido, a absorção da vitamina E é variável e influenciada por múltiplos fatores, sendo os mais importantes a idade gestacional e os componentes da dieta. Quanto à vitamina A, a presença de lipases estimulada pelos sais biliares no leite contribui para a hidrólise dos ésteres de retinila, favorecendo a liberação e a absorção. (Euclides, 1997).

Quando não é possível a amamentação ao seio, pode-se recorrer à bancos de leite para suprimento das necessidades do bebê. A doação de leites das mães nos bancos de leite humano é de fundamental importância à saúde do bebê, principalmente para o cuidado e tratamento de bebês prematuros e com baixo peso ao nascer, recém nascidos doentes ou com alguma doença infecciosa severa (Góes *et al*, 2002).

Atualmente já é consenso que os nutrientes provenientes do leite materno geralmente atingem o requerimento da criança, com baixa probabilidade de deficiência ou excesso (Jackson *et al*, 2004). Porém, como já mencionado, a secreção destes nutrientes está relacionada a diversos fatores, sendo questionável assegurar que as necessidades nutricionais dos bebês estão sendo supridas.

2.7 Métodos de manipulação da composição vitamínica do leite e seus efeitos

Em situações de pobreza e nas regiões onde os alimentos com alto teor de vitamina A são raros e caros, recomenda-se fornecer suplementação de vitamina A durante a gestação, respeitando a posologia e a frequência de administração (OMS, 2001). Em mulheres desnutridas com peso muito reduzido, além daquela com gestações múltiplas, ou quando a vitamina A no leite é baixa, a suplementação materna com pequenas doses de vitamina A pode ser necessária (Williams, 1997; Allen *et al*, 2001).

A recomendação de suplementação de vitamina A para mães na gestação e lactação é questionável em função dos resultados conflitantes (Rice *et al*, 2000). Olafsdottir *et al* (2001) suplementaram 77 mães lactantes com óleo de fígado de bacalhau e compararam seu efeito na dieta materna e na composição do leite. Concluíram os autores que há uma relação entre o conteúdo de vitaminas A e E no leite e a dieta materna. Além disso, observaram que a recomendação de vitaminas lipossolúveis para a mãe lactente pode ser mais facilmente atingida com a suplementação com óleo de bacalhau do que com a dieta habitual.

Entretanto, Gossage *et al* (2002) suplementaram a dieta de 21 mães entre 19 e 39 anos com beta-caroteno e não obteve resultado significativo entre o grupo placebo e o suplementado. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente por Canfield *et al* (1997) onde não houve mudança significativa nos níveis de retinol e α -tocoferol sérico e no leite materno, após suplementação com beta-caroteno.

Além disso, em outro estudo, Gossage *et al* (2000) também analisaram o efeito da suplementação de beta-caroteno em lactantes e verificaram que a mesma não afetou a produção de linfócito T em resposta à fitohemaglutinina, não apresentando função imunocompetente.

Estudos recentes mostram que suplementando vitamina E na dieta materna, incrementou o conteúdo de alfa-tocoferol da fração lipídica do plasma de vacas leiteiras, com conseqüente repasse ao leite. A associação do tocoferol com a membrana globular lipídica do leite é considerada o principal determinante da estabilidade oxidativa do leite (Yang *et al*, 2004; Havemose *et al*, 2004).

Desta forma, a partir da avaliação nutricional das mães e do padrão de ingestão alimentar de vitaminas pode ser necessário recomendar uma suplementação pontual de vitaminas assegurando assim o aporte energético e nutricional dos lactentes.

2.8 Métodos de análise de vitaminas

A análise de vitaminas pode ser feita por espectrofotometria e mais recentemente por cromatografia. (Strobel; Heinrich; Biesalski, 2000). Esta técnica mostra-se vantajosa devido à sua sensibilidade, seletividade, rapidez e segurança na determinação de vitaminas lipossolúveis em alimentos e fluidos biológicos (Lledó; Vera; Andrés, 2001; Gomis; Fernández; Alvarez, 2000). A técnica mais freqüentemente usada para determinação simultânea de vitaminas lipossolúveis é a *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) ou também chamada de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Escrivá *et al*, 2002).

O *HPLC* emprega pequenas colunas recheadas com materiais especiais, constituindo-se a fase estacionária, e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões, em fluxo e comprimento de ondas (λ) definidos, de acordo com características dos compostos. Mostra capacidade de realizar separações e análises quantitativas de várias substâncias em diversos tipos de amostras em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Collins; Braga; Bonato, 1990).

O *HPLC* tem sido aplicado com sucesso na separação de vitaminas lipossolúveis em solução padrão, fórmulas farmacêuticas (Paulo *et al*, 1999), soro humano (Khachik *et al*, 1997; Po; Ho; Gong, 1997), produtos animais (Qian; Sheng, 1998; Väänänen *et al*, 2000) e outras amostras alimentícias (Wielinski; Olszanowski, 1999) pela confiabilidade, simplicidade e rapidez do método (Qian; Sheng, 1998). Além disso, as determinações isoladas de vitamina A e E por *HPLC* constitui-se base do método oficial (AOAC,1998). Entretanto, mais recentemente, sistema para determinação simultânea de vitaminas A, D₂, D₃, E e K em leites (Blanco; Fernandez; Gutierrez, 2000), tem sido vantajoso em relação a detecção e quantificação isoladas dos compostos com função de vitaminas A e E (Paixão; Stamford, 2002; Paixão; Campos, 2003; Paixão; Stamford, 2004).

A utilização do *HPLC* é também eficaz em matrizes lácteas fluidas (Zamarreño *et al*, 1996; Manzi; Panfili; Pizzaferrato,1996; Pó, Gong; Ho, 1997; Hewavitharana; Bkakel, 1998; Escrivá *et al*, 2002) e em pó, achocolatados, à base de leite de soja (Paixão; Stamford, 2002) e em fórmulas infantis (Hurtado *et al*, 1997; Corbella *et al*,

1999; Rodrigo *et al*, 2002; Mendoza *et al*, 2003; Paixão; Campos, 2003; Heudi; Trisconi; Blake, 2004).

A separação das vitaminas lipossolúveis da matriz láctea é procedida pela extração das mesmas com solventes apolares (Hewavitharana; Brakel; Harnett, 1996; Lledó; Vera; Andrés, 2001), com prévia saponificação com KOH etanólico (Tanumihardjo; Penniston, 2002) ou metanólico (Gong; Ho, 1997; Wielinski; Olszanowski, 1999; Väänänen *et al*, 2000) e a seguinte reconstituição em fase móvel (Gong; Ho, 1997; Paixão; Campos, 2003; Paixão; Stamford, 2004). As análises quantitativas de retinol e α -tocoferol geralmente utilizam detecção de UV na faixa de 313 a 328nm para retinol e 292nm, para o alfa-tocoferol, correspondendo ao comprimento de onda (λ) máximo.

As análises de vitaminas são de grande interesse na avaliação de várias desordens bioquímicas e nutricionais e contribui para assegurar adequação nutricional. Recentemente, um grande número de fontes ou matrizes têm sido estudados para o desenvolvimento de métodos adequados para análise de vitaminas lipossolúveis em alimentos (Blanco; Fernandez; Gutierrez, 2000; De Vries; Silvera, 2002).

O *HPLC* pode ser utilizado com diferentes sistemas de detecção. Para determinação de vitamina E, detectores de fluorescência são geralmente usados, pela sua alta sensibilidade e seletividade. Entretanto, a absorbância em ultravioleta pode ser preferida por permitir determinação simultânea de outras vitaminas lipossolúveis, sendo mais freqüentemente usada (Eldin *et al*, 2000; Lledó; Vera; Andrés, 2001; Paixão; Stamford, 2004). Outros sistemas de detecção, como arranjo de diodo e espectrometria

de massa podem ser utilizados com as vantagens de detecção com simultâneos comprimentos de onda monitorando desta forma, isômeros e interferentes em matrizes complexas (Paixão; Stamford, 2002; Paixão; Stamford, 2004; Heudi; Trisconi; Blake, 2004).

Um estudo realizado por Paixão e Campos (2003), obtiveram taxas de recuperação superiores a 67% em matrizes lácteas líquidas na quantificação de vitaminas A e E. Neste estudo, fixou-se outro tempo de saponificação, de 3 ou 6 horas. Tal metodologia mostra-se vantajosa em relação ao método oficial, devido reduzir o tempo de saponificação 12 horas para 3 ou 6 horas, e assim reduziu o tempo de exposição das vitaminas, por tratar a amostra sem influxo de nitrogênio, como propõe o método oficial.

Para prevenir a isomerização e oxidação das vitaminas durante a saponificação, é necessário seleção e adição inicial de antioxidantes que podem ser o ácido ascórbico ou butilhidroxitolueno (BHT) (Qian; Sheng, 1998; Lledó; Vera; Andrés, 2001), pelo pré-condicionamento da coluna de sílica com α -tocoferol (Hewavitharana; Bkakil, 1998) e com remoção do oxigênio por nitrogênio (Väänänen *et al*, 2000). Vários trabalhos têm reportado o uso do pirogalol como agente antioxidante. O pirogalol é solúvel em solventes polares e não-polares apresentando vantagens entre os outros antioxidantes, pois o BHT é solúvel em solventes não-polares e o ácido ascórbico são solúveis apenas em solventes polares. Além disso, a ausência de pirogalol proporcionou baixa extratibilidade e alta variabilidade (Paixão; Campos, 2003; Paixão; Stamford, 2004).

O modo usual de construção de curvas de padrões é através de *pools*, para os métodos simultâneos de quantificação, enquanto o procedimento de injeção pode seguir ordem crescente de concentração e alternativamente aleatorizar os pontos (*pools*) e repetições, de modo que ambos procedimentos conduzem a quantificação segura pela equação da reta obtida, plotando-se área *versus* concentração. A adição de padrão interno serve para corrigir oscilações em áreas, decorrente do sistema cromatográfico (Collins; Braga; Bonato, 1990; Paixão; Campos, 2003; Paixão; Stamford, 2004).

3. OBJETIVOS

- Mensurar as vitaminas A (retinol-*trans*) e E (alfa-tocoferol) no leite materno em doadoras primíparas e multíparas;
- Comparar os níveis destas vitaminas no leite materno em distintas fases (coloostro, transição e maduro);
- Avaliar o efeito da alimentação materna sobre os níveis de vitaminas A e E no leite.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sujeitos

Uma amostra total de 18 mães voluntárias foi selecionada de acordo com o local de residência, idade, número de gestações, gestação de um único conceito e ausência de doenças crônicas durante a gestação. Do total, 50% foram categorizadas em mães primíparas e 50 % em multíparas, com idades entre 16 e 45 anos que apresentassem produção de leite excedente, isto é, suficiente para coleta sem comprometer a alimentação do recém-nascido.

As características das mães participantes estão ilustradas no questionário de identificação das mães (Anexo A). Todas as mães foram orientadas quanto aos procedimentos da pesquisa e utilização dos dados das mesmas, as quais assinaram o termo de consentimento (Anexo B). Todas se apresentavam aparentemente saudáveis, não fumantes, não-diabéticas e sem complicações na gravidez. As mães foram questionadas sobre a frequência de consumo de alimentos tradicionalmente fonte de vitaminas A e E, separados por grupos, conforme discriminados no Anexo A.

4.2 Seleção e caracterização da amostra

As amostras de leite colostro foram obtidas a partir de mães residentes na Região Metropolitana do Recife internadas na Maternidade da Encruzilhada (CISAM) e Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os leites de transição e maduro foram coletados nas residências das participantes. O volume de leite coletado variou de 10 a 25mL, para cada fase (colostro, transição e maduro), de ambas as mamas por ordenha manual e/ou mecânica e acondicionadas em recipientes de vidro previamente esterilizados. Em seguida, foram armazenados sob refrigeração a $\pm 5^{\circ}\text{C}$ permanecendo resfriados até no máximo 48 horas até a extração das vitaminas.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Pernambuco do Hospital das Clínicas e Maternidade da Encruzilhada.

4.3 Procedimento de extração das vitaminas

As amostras foram processadas no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL), no Departamento de Nutrição da UFPE. As vitaminas A e E foram determinadas segundo a modificação do método oficial da AOAC (*Association Official of Analytical Chemistry*) (1998), descrita por Paixão & Stamford (2002) e Paixão & Campos (2003). Na extração, tomou-se 25mL das amostras pré-aquecidas a 40°C por 30 minutos em banho-maria. Adicionou-se 50mL de KOH-metanólico a 20%p/v e pirogalol a 1%p/v, permanecendo por 3h para saponificar em frascos *Erlemeyers*, protegidos da luz e oxigênio. Após a saponificação, a re-extração das vitaminas foi obtida adicionando-se 100mL (50+50) de éter etílico/ éter de petróleo 20%. Lavou-se com água destilada até obtenção de pH neutro, concentrou-se em um evaporador rotatório e redissolveu-se o extrato em 5mL de éter de petróleo e evaporou-se novamente o extrato, em banho-maria. Redissolveu-se em 10mL de etanol espectrocópico e filtrou-se em *fluoropore* 0,45 μm . Os extratos foram estocados em vidros âmbar, devidamente tampados e etiquetados em *freezer*, por no máximo 48 horas.

4.4 Condições cromatográficas

A coluna cromatográfica utilizada foi a de fase reversa *SPHERISORB-ODS* 150 x 3,2 mm di, ϕ 5 μ m e fase móvel 100% metanol (grau cromatográfico) a um fluxo de 0,5mL/min. A corrida cromatográfica foi de 8,5 minutos, no qual o primeiro canal (até 5 minutos) o eluato foi lido a 325nm e a partir deste a 292nm, que corresponde respectivamente a máximos de absorção das vitaminas A (retinol-*trans*) e E (alfa-tocoferol). O segundo canal, monitorou as amostras em um comprimento de onda fixo de 265nm para estabelecimento das razões de absorbância do $\lambda_{\text{máximo}}/\lambda_{265}$, conforme originalmente descrito por Paixão & Stamford (2002) e Paixão & Campos (2003).

4.5 Equipamento

Na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF- UFPE) utilizou-se o equipamento de HPLC (bomba da Waters e injetor *Rheodyne*) acoplado a detector de UV, com programa de comprimento de onda (λ) de 325nm para o retinol-*trans* e 292nm para o alfa-tocoferol.

4.6 Sistema de quantificação

As curvas de calibração foram obtidas a partir de soluções padrões estoques individuais de cada vitamina preparadas por diluição do padrão em etanol grau espectroscópico. As concentrações finais obtidas foram 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 e 100 μ g/mL para retinol-*trans*, 25.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0 e 1000 μ g/mL para alfa-tocoferol enquanto utilizou-se um valor fixo de 25 μ g/mL para o padrão interno (acetato de retinila). Os *pools* obtidos foram injetados no equipamento de HPLC no modo pontual, respeitando a ordem crescente de diluição, e no modo aleatório para respectivas concentrações.

A quantificação de retinol-*trans* e de alfa-tocoferol foi obtida por três sistemas de quantificação: modo crescente de concentrações e aleatório, aleatorizando concentrações e repetições e por último no modo padrão interno, com adição de acetato

de retinila. Para conversão das áreas obtidas, estimou-se a concentração das vitaminas estudadas através da aplicação das equações de reta ilustradas nos quadros abaixo.

Modo crescente de concentrações

Composto	Equação	R
Retinol	$Y = 101.049 + 313.433 X$	0.9997
Alfa-tocoferol	$Y = 64.657 + 16.811X$	0.9998

Modo Aleatório

Composto	Equação	R
Retinol	$Y = 132.289 + 317.916 X$	0.9998
Alfa-tocoferol	$Y = 75.962 + 17.247 X$	0.9998

Padrão interno

Composto	Equação	R
Retinol	$Y = 0.002564 + 0.05431 X$	0.9991
Alfa-tocoferol	$Y = 0.01388 + 0.0295 X$	0.9992

4.7 Análise estatística

As comparações estatísticas dos dados das vitaminas foram tratadas por diferenças entre médias pelo teste “t” de *student* quando foram atingidos os critérios de normalidade. Quando um destes critérios não foi obtido, procedeu-se a comparação inter-grupos pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Na comparação de mais de duas médias, utilizou-se a análise de variância uma via, aplicando-se o teste de Sheffé “*a posteriori*”. O nível de significância adotado foi de 5% para a rejeição da hipótese de nulidade. Os dados foram apresentados como média \pm desvio-padrão nos distintos grupos caracterizados. Os demais dados foram tabulados graficamente pelo programa *Excel* e os testes estatísticos foram realizados pelo SPSS Versão 12.1.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Perfil sócio-econômico das doadoras

A maioria das mães estudadas tinha entre 20 e 25 anos, seguido das mães adolescentes com o mesmo percentual de mães com idade entre 30 e 34 anos (Tabela 4). A média de escolaridade das mães foi 7.7 anos e tinham em média 1.9 filho. Resultados similares foram encontrados por Gigante, Victora e Barros (2000) em um estudo de coorte no Rio Grande do Sul.

Tabela 4 - Perfil das mães estudadas (N=18)

Variáveis	N	%
Idade		
16 a 19 anos	5	28
20 a 24 anos	6	32
25 a 29 anos	1	6
30 a 34 anos	5	28
35 a 39 anos	1	6
Educação materna (anos completos)		
0 - 4	2	12
5 -8	8	44
9 ou mais	8	44
Número de filhos + Recém nascido		
Nenhum	-	-
Um	9	50
Dois	4	22
Três (ou mais para a referência)	5	28
Tipo de parto		
Normal	11	61
Cesariana	7	39

Embora, quando comparou-se os dados de idade das mães doadoras, variou-se mais de 10 unidades percentuais nas categorias, mães abaixo de 20 anos e acima de 30 anos, diferindo notadamente daquelas do sul do país (Weiderpass *et al*, 1998).

Os partos normais foram superiores aos de cesariana representando mais de 60% dos nascimentos, similares tanto no estudo realizado como no de Weiderpass *et al* (1998), os quais compararam a incidência de amamentação conforme o tipo de parto. Os resultados encontrados mostraram que não houve diferença nas incidências de amamentação conforme o tipo de parto, condizente com outros estudos já realizados no Brasil.

De acordo com a tabela 5, a média de idade, escolaridade e percentual de estado civil casada foram inferiores aos resultados encontrados por Chapman *et al* (2001), tanto em primíparas quanto nas múltiparas. Em ambos trabalhos, observou-se que as múltiparas têm mais idade e menos escolaridade. O percentual de crianças do sexo masculino do encontrado por Chapman *et al* (2001) foi maior nas primíparas enquanto neste trabalho este percentual foi maior em múltiparas.

Tabela 5- Características das mães estratificadas segundo o grau de paridade

Variáveis	Chapman <i>et al</i> (2001)		Presente trabalho	
	<i>Primíparas</i> (n= 14)	<i>Múltiparas</i> (n=15)	<i>Primíparas</i> (n=9)	<i>Múltiparas</i> (n=9)
Idade (anos)	30.9 ± 3.0	33.6 ± 4.1	21.3 ± 4.7	27.3 ± 7.0
Educação (em anos)	16.5 ± 2.7	14.4 ± 1.9	9.6 ± 2.9	5.9 ± 1.8
Casadas (%)	92.9	80.0	44.0	33.0
Sexo do bebê (% masc.)	64.3	46.7	44.0	67.0

Mendonça *et al* (2002) observaram que a média de produção de leite das vacas que amamentaram fêmeas não diferiu das que amamentaram machos, não variando a produção de leite em função do sexo. Gigante, Victora e Barros (2000), evidenciaram que as mães com 20 anos ou mais e as multíparas amamentaram seus filhos por mais tempo, cuja média de escolaridade foi de 6.8 anos e que não houve diferença significativa no período de amamentação e na escolaridade materna.

Dimenstein *et al* (2003) não obtiveram, para tal comparação (multíparas e primíparas) correlação entre escolaridade e os níveis de retinol, exceto sob condições de extrema pobreza. Os dados das mães podem ser melhor visualizados na figura 1.

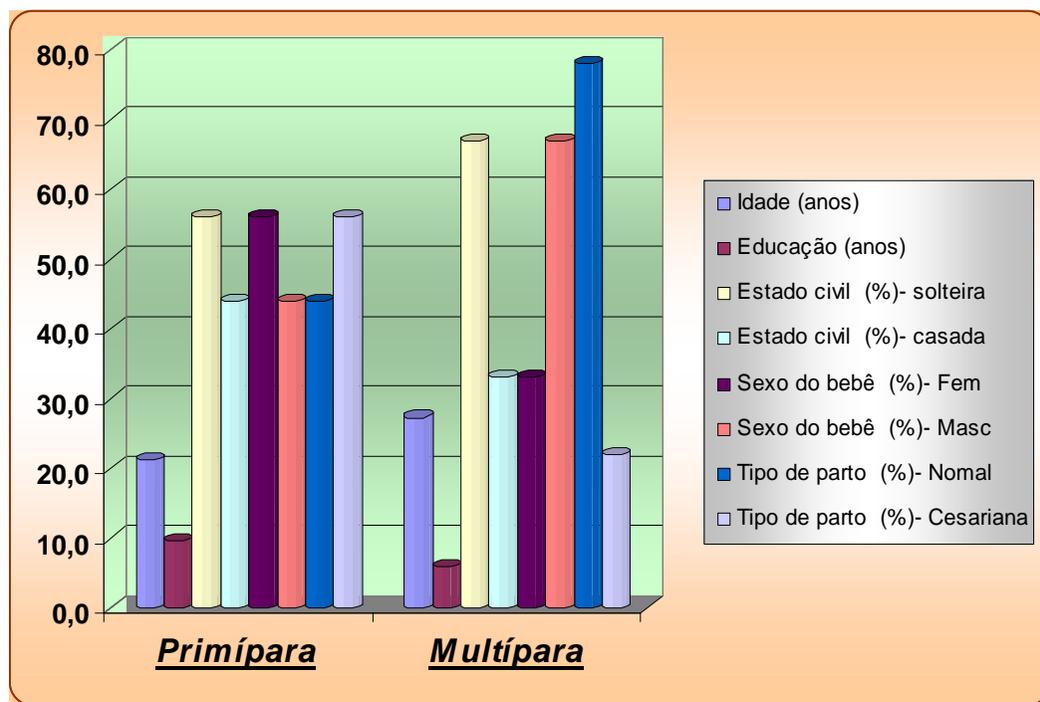


Figura 1- Perfil das doadoras de acordo com o número de gestações prévias.

No Brasil, existem poucos estudos publicados relacionando a condição socioeconômica materna e dos indicadores de saúde sobre os níveis de vitamina A no colostro (Dimenstein *et al*, 2003).

5.2 Mensuração de vitaminas nos leites de diferentes fases

A figura 2 mostra a diferenciação básica entre leite colostro, transição e maduro nos três modos de quantificação. Não houve diferença significativa nestas concentrações ao se comparar os dados por diferentes modos de injeção e de quantificação. O modo de injeção do mais diluído ao concentrado (ordem crescente de concentração) foi o escolhido para apresentar os demais resultados.

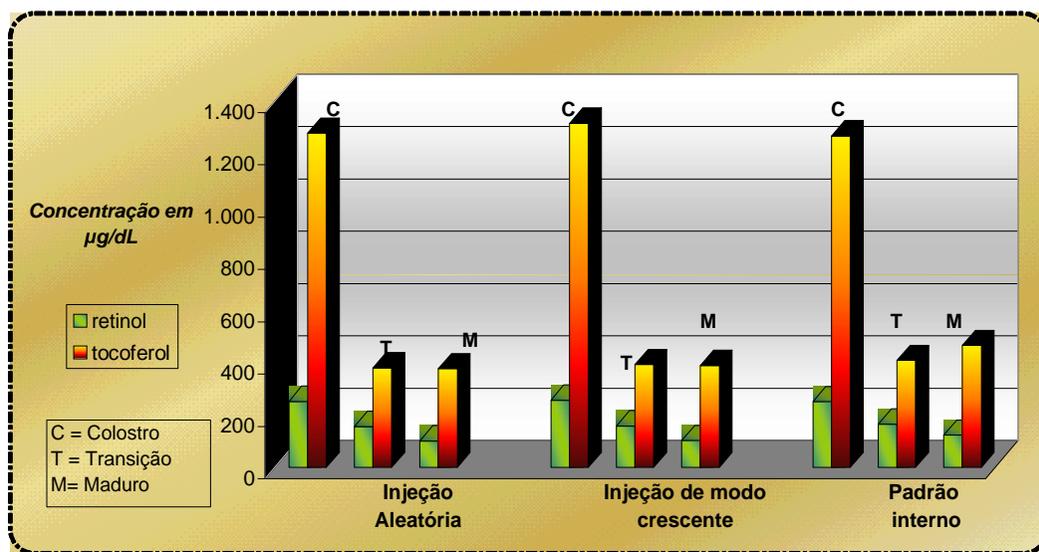


Figura 2 - Níveis de retinol e tocoferol em leite de distintas fases

Houve declínio nos níveis das vitaminas A e E ao longo da lactação (figura 3), correspondendo aos dados publicados por Macias & Schweigert (2001), que além destas vitaminas reduziu também os níveis de carotenóides polares e apolares (Schweigert *et al*, 2004).

Em espécies como o homem, bovino, focas e outros animais, um acúmulo de vitaminas lipossolúveis no colostro pode ser observado (Schweigert; Gottwald, 1999). De um modo geral, a mudança de fase do leite reduz o nível de tocoferol mais acentuadamente do que o retinol (figura 3). O percentual de redução do tocoferol, de colostro para maduro, atingiu 70%. Este decréscimo não é só encontrado no leite humano. Macias e Schweigert (2001) relatam que dados similares são também encontrados em outras espécies (Tabela 6).

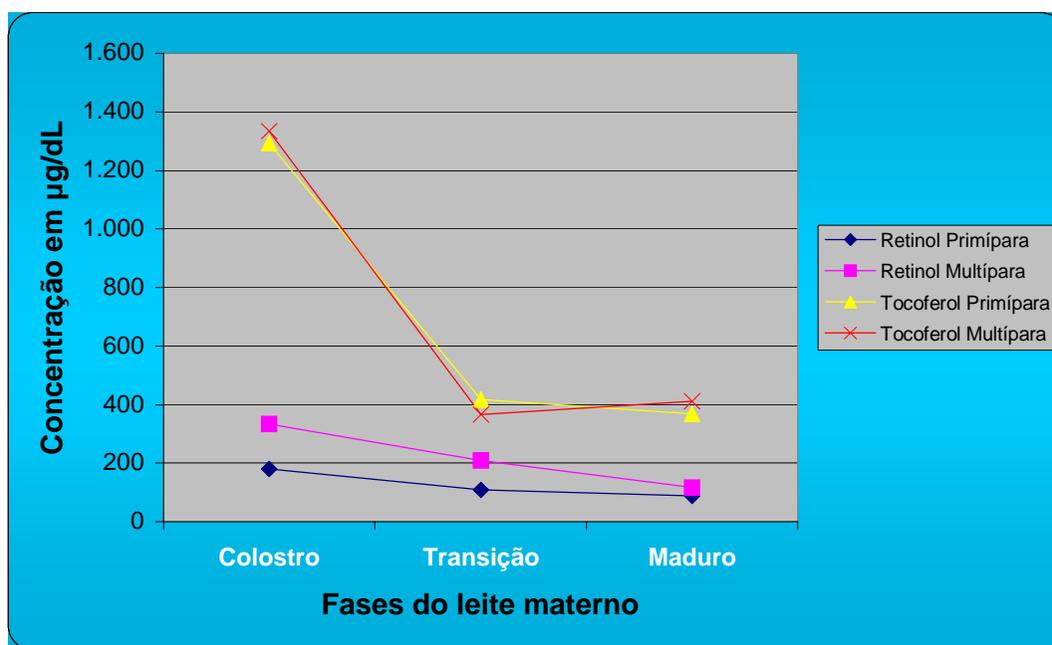


Figura 3- Comportamento de declínio dos níveis de vitaminas no período inicial da lactação

O colostro é particularmente rico em retinol, mas durante o primeiro mês os níveis de vitamina A declinam rapidamente para menos que a metade (Ross; Harvey, 2003). Resultados semelhantes foram encontrados para retinol, porém, não

ultrapassando 50%, exceto na transição de colostro para maduro (67%) nas multíparas (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentrações de vitaminas A e E segundo grau de paridade

Fases do leite (30 dias de lactação)	Primíparas (n=9)			Multíparas (n=9)		
	Concentração (µg/dL)	CV(%)	(*) % redução	Concentração (µg/dL)	CV(%)	(*) % redução
Retinol						
Colostro	179 ± 57 ^a	32	-	334 ± 142 ^e	42	-
Transição	109 ± 64 ^b	59	39	208 ± 122 ^f	59	35
Maduro	89 ± 18 ^b	21	50	116 ± 38 ^g	32	65
Tocoferol						
Colostro	1293 ± 701 ^c	54	-	1335 ± 906 ^c	68	-
Transição	418 ± 226 ^d	54	68	367 ± 98 ^{di}	27	72
Maduro	368 ± 48 ^d	13	71	412 ± 82 ^{hi}	20	69

Concentração em Média ± DP. Dados em duplicatas.

(*) Percentual de redução em relação ao colostro.

Houve diferença significativa ($p < 0,001$) das vitaminas A e E entre primíparas e multíparas em todas as fases de lactação estudadas, exceto para o tocoferol do colostro. Entretanto, não houve diferença significativa entre retinol e tocoferol de primíparas e tocoferol de multíparas ao passar de transição para maduro. Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (Tabela 6).

As multíparas apresentaram o dobro de retinol no colostro em relação às primíparas, 90% a mais no leite de transição e 30% a mais no leite maduro (Tabela 6). No tocoferol, as primíparas apresentaram maiores níveis nos leites colostro e transição,

exceto no leite maduro (figura 3). Não há dados na literatura que façam distinção de vitaminas em função da paridade, estratificando as distintas fases.

Na figura 3, pode-se visualizar o decréscimo das vitaminas ao longo da evolução da lactação no período estudado. Embora a literatura afirme que há um declínio na concentração das vitaminas ao passar de uma fase para outra (Tabelas 7 e 8), nas multíparas, o leite de transição ao passar para leite maduro houve um aumento de 17% no tocoferol, igual ao encontrado por Schweigert & Gottwald (1999), apesar de que não foi verificado o mesmo fato no retinol consistindo a hipótese de redução até o estabelecimento do leite maduro. Na fase de colostro e transição, o leite ainda está passando por modificações na sua composição, tendendo manter estabilidade até obtenção de um leite mais estável, que pode ou não persistir ao longo da lactação. Este fato pode ser comprovado pela redução do coeficiente de variação, em ambas as vitaminas, à medida em que o leite torna-se maduro, caindo de ~50% para ~20% de variabilidade, índice aceito comumente na avaliação de amostras por HPLC (Paixão; Campos, 2003; Paixão; Stamford, 2004).

Tabela 7 - Níveis de retinol ($\mu\text{g/dL}$) em várias amostras de leites em distintas fases

Referências	Local da pesquisa	Colostro	Transição	Maduro
Nosso estudo	Brasil	256.92 \pm 132.34	158.54 \pm 108.21	102.69 \pm 32.40
Schweigert <i>et al</i> (2004)	Alemanha	153.01 \pm 72.36	-	82.94 \pm 32.03
Dimenstein <i>et al</i> (2003)	Brasil	93.10 \pm 51.10		
Góes <i>et al</i> (2002)	Brasil	-	-	43.19 \pm 25.60
Segura & Alquinta (1993)	Espanha	-	-	60.00
Rice <i>et al</i> (2000)	Bangladesh	-	40.33	-
Schweigert & Gottwald (1999) *	Alemanha	1270.00 \pm 390.00	990.00 \pm 320.00	710.00 \pm 360.00
Macias & Schweigert (2001)	Cuba	102.00 \pm 56.00	50.00 \pm 21.00	33.00 \pm 14.00
Olafsdottir <i>et al</i> (2001)	Islândia	-	-	61.80 \pm 3.50
Martinez; Ortega; Andrés (1997)	Espanha	-	79.80 \pm 27.20	67.30 \pm 28.70

* Em éguas. Os demais foram em leite humano.

Tabela 8-Níveis de tocoferol ($\mu\text{g/dL}$) em várias amostras de leites em distintas fases

Referências	Local de pesquisa	Colostro	Transição	Maduro
Nosso estudo	Brasil	1313.94 ± 798.66	392.53 ± 173.57	389.86 ± 69.84
Schweigert <i>et al</i> (2004)	Alemanha	2197.30 ± 1466.30	-	567.60 ± 219.30
Ortega <i>et al</i> (1998)	Espanha	-	163.40 ± 56.76	94.60 ± 30.96
Segura & Alquinta (1993)	Espanha	-	-	520.00
Schweigert & Gottwald (1999)*	Alemanha	83.40 ± 16.40	33.80 ± 5.70	39.50 ± 6.70
Olafsdottir <i>et al</i> (2001)	Islândia	-	-	414.40 ± 20.10

* Em éguas. Os demais foram em leite humano.

Os dados sumarizados nas tabelas 7 e 8 sugerem que dados obtidos neste trabalho são de certa confiabilidade pela magnitude de variação, entretanto, fatores determinantes de variação não estão explicitados suficientemente nos trabalhos apresentados.

Olafsdottir *et al* (2001) que obtiveram uma média do conteúdo de vitamina E de 414µg/dL de leite materno maduro, nos dois primeiros meses de lactação, cujo dado é superior que aos 4 meses de lactação, evidencia que há uma tendência de diminuição ao longo da lactação, devido mecanismos pouco esclarecidos e diferenciado inter e intraespecíficos.

A concentração de vitamina E encontrada em focas por Debier *et al* (2002) foi 8 vezes maior no colostro do que no leite maduro. Os autores relatam também que a concentração de tocoferol em focas pode ser de 4 a 90 vezes superior ao leite humano e de vaca.

Elevadas concentrações de tocoferol no colostro são recomendadas para fornecer rapidamente um poderoso antioxidante para o recém-nascido, que está susceptível ao estresse oxidativo, resultante da transição abrupta de um meio com baixa pressão de oxigênio para um meio com elevada pressão de oxigênio (Debier *et al*, 2002).

Os dados sumarizados na Tabela 9, indicam que, os valores obtidos refletem pequena variabilidade entre os sistemas de injeção dos padrões, cujos valores são compatíveis aos obtidos por Paixão & Stamford (2002). Através deste estudo permitiu-se rastrear os valores de Uabs, como elemento de validação interna do experimento desde que não se dispôs de amostras suficientes para obter taxas de recuperação.

Tabela 9 - Razão de Absorvância entre λ máximo e λ fixo e tempo de retenção ajustado (tR') em padrões e amostras de leite humano

	Uabs λ 325/265nm	tR' retinol- <i>trans</i>	Uabs λ 292/265nm	tR' α -tocoferol
Todas as mães				
Mínimo – Máximo	6.93 – 11.94	1.78 – 2.11	4.00 – 10.25	5.75 – 6.78
Média \pm dp	10.26 \pm 0.69	1.90 \pm 0.06	6,67 \pm 1.54	6,31 \pm 0.33
Padrões injetados aleatoriamente				
Mínimo – Máximo	9.43 – 13.00		6,66 – 11,00	
Média \pm dp	9.98 \pm 0.84	1.72 \pm 0.01	8.52 \pm 0.94	5.67 \pm 0.09
Padrões injetados em ordem crescente				
Mínimo – Máximo	9.56 – 12.50		6.40 – 10.00	
Média \pm dp	10.04 \pm 0.63	1.77 \pm 0.08	8.39 \pm 0.87	5.67 \pm 0.09

* Dados obtidos em duplicatas de leites de mesma doadora em diferentes fases

** Dados dos padrões obtidos em triplicatas de 6 *pool* distintos, variando proporcionalmente 1:10 massa/massa de retinol e de tocoferol.

5.3 Efeito da alimentação sobre os níveis de vitaminas A e E no leite humano

Olafsdottir *et al* (2001) utilizou em seu estudo o método recordatório de ingestão dietética de 24 horas para investigar o efeito da ingestão durante um curto período de tempo. Os autores relataram que este método é o mais conveniente e menos estressante para a mãe lactante, mas tem a desvantagem de que necessariamente não reflete a média

de ingestão alimentar do participante, pois o dia avaliado pode ser um dia atípico. Para minimizar este efeito, sugeriu questionar sobre a frequência da ingestão e os hábitos usuais. Neste estudo, foi levado em consideração o hábito alimentar da mãe, com frequência semanal ou esporádica, conforme descrito a seguir.

De acordo com o inquérito alimentar geral (item 3 do Anexo A) avaliou-se o consumo de vários grupos de alimentos já descritos anteriormente. Para melhor avaliarmos os hábitos alimentares, os conceitos “nunca”, “às vezes” e “1 vez por semana” foram consolidados e representados como “< 1 vez por semana”; “2 vezes por semana” foi considerado com a mesma nomenclatura e “3 vezes por semana” e “diariamente”, como “> 3 vezes por semana”. As figuras 4a a 4e sintetizam os resultados diferenciados entre primíparas e multíparas.

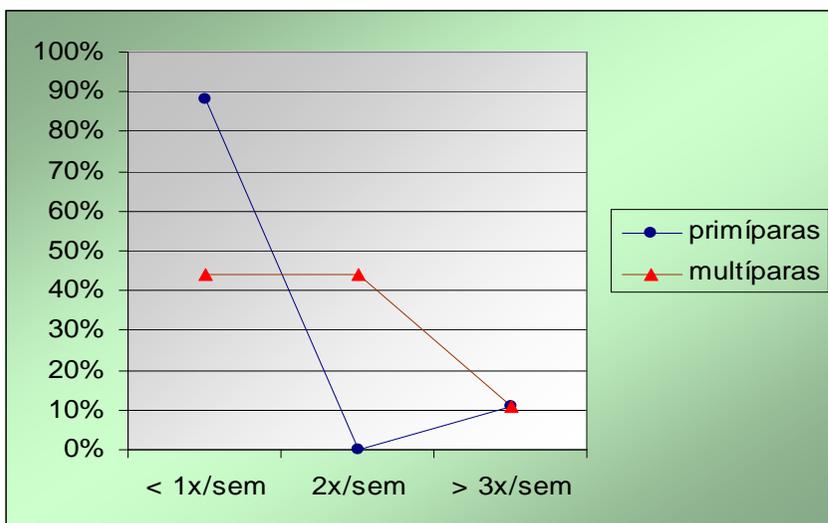


Figura 4a - Frequência de consumo de fígado e vísceras

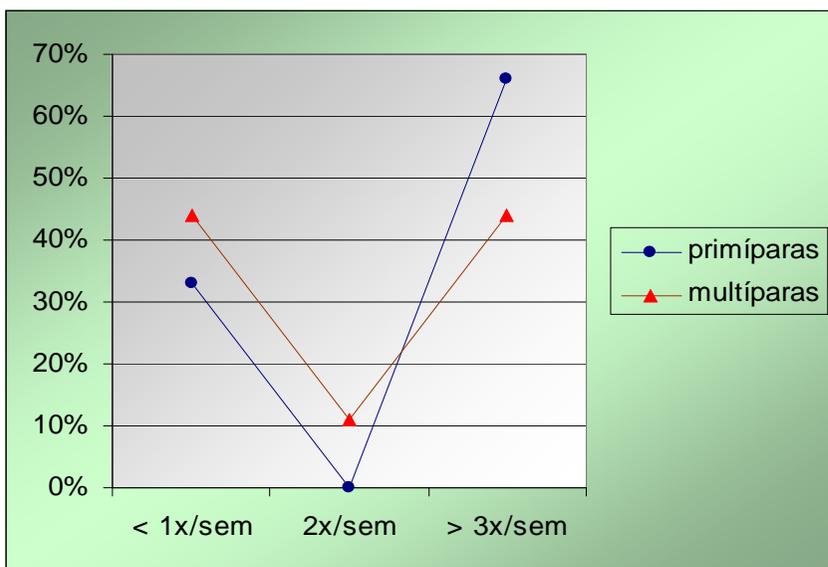


Figura 4b - Frequência de consumo de leite, queijo, ovo

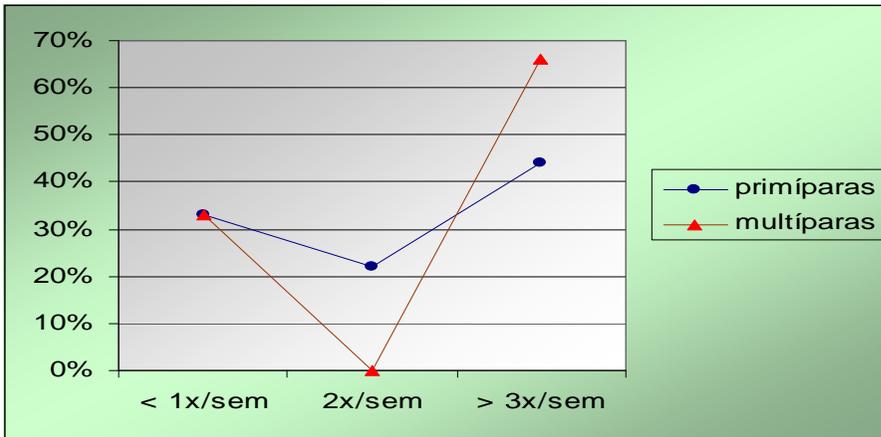


Figura 4c - Frequência de consumo de carne bovina, aves e peixes

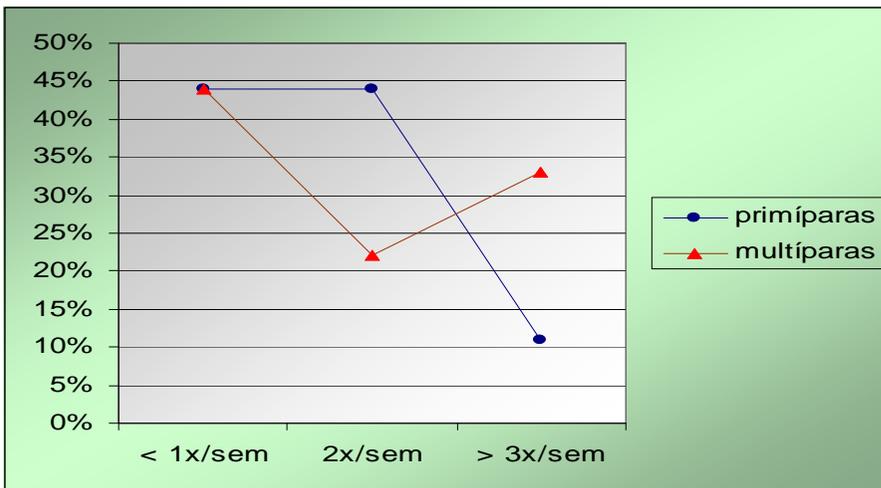


Figura 4d - Frequência de consumo de cenoura, pimentão e abóbora

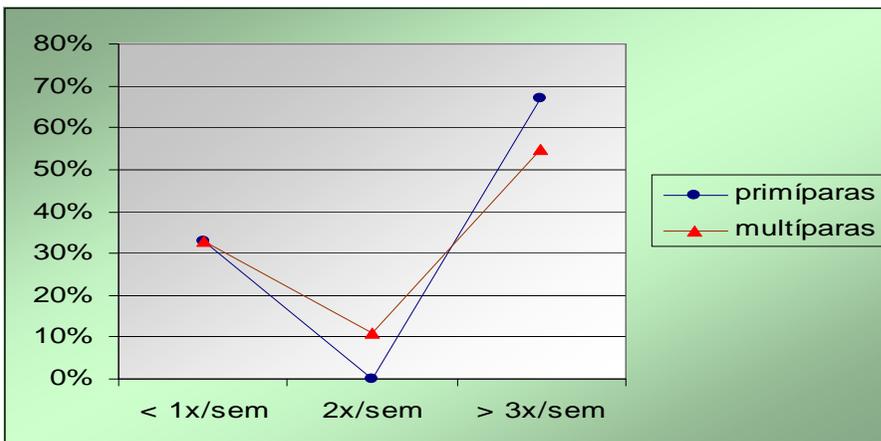


Figura 4e - Frequência de consumo de margarina, manteiga e óleo

De acordo com a figura 4a, o consumo de alimentos de origem animal fonte de vitamina A, como fígado e vísceras foram mais freqüente nas multíparas que nas primíparas. Nestas, o índice de abstenção do consumo foi quase 90% nas primíparas. Sabe-se que alimentos como o fígado são ricos em vitamina A e são recomendados durante a gravidez e lactação, podendo, se necessário, ser suplementado (Martinez; Ortega; Andrés; 1997; Olafsdottir *et al*, 2001). Igualmente, observou-se elevada freqüência de consumo, acima de 70% das mães primíparas, em outras classes de alimentos fontes de vitaminas A (Figuras 4b e 4c).

O consumo de cenoura, pimentão e abóbora (figura 4d) se manteve no mesmo patamar no consumo menor que 1 vez por semana, diminuindo a freqüência do consumo em primíparas, com maior freqüência de consumo na multíparas. Estes alimentos são fontes de beta-caroteno, que *in vivo* são convertidos em vitamina A e juntamente com o alfa-caroteno e β -criptoxantina somam mais da metade dos carotenóides encontrados no leite (Canfield *et al*, 1997; Schweigert *et al*, 2004). Como o consumo foi maior de alimentos de origem animal, fontes de vitamina A em ordem crescente de seu valor de vitamina A, destacados nas figuras 4a, 4b e 4c, justificando-se, em parte, os elevados teores de vitamina A nos leites das multíparas, inclusive as diferenças observadas entre fases da lactação.

Em países Europeus, o consumo de cereais, vegetais e outras fontes de vitamina E não é comum. Entretanto, óleos de peixes, originalmente rico em gorduras poliinsaturadas, têm baixo conteúdo de tocoferol, de freqüente consumo em países nórdicos. Nestes países têm se observado que há baixa ingestão de vitamina E, e mesmo

assim, não influencia no teor desta vitamina no leite materno (Olafsdottir *et al*, 2001). A maioria dos autores relata que aumentando a ingestão de vitamina E na dieta, aumenta nos níveis da mesma no leite (Ortega *et al*, 1999).

O leite, o ovo e as margarinas/ óleos/ manteiga são excelentes fontes de vitamina E (Mahan,; Escott-Stump, 2002). Os lipídios apresentam elevada variabilidade. O conteúdo de gordura muda durante cada amamentação e entre as amamentações, de acordo com os estágios de lactação (Pons *et al*, 2000).

Com relação à figura 4c, as multíparas apresentaram maior consumo de carnes, frango e peixes. As figuras 4b e 4e apresentam certa similaridade, com maior frequência de consumo destes alimentos entre primíparas. Em contrapartida, a compensação no consumo de alimentos com diferentes teores de gordura pode explicar o discreto aumento dos níveis de tocoferol entre primíparas e multíparas. Porém, no colostro, carotenóides, vitamina A e vitamina E mostram-se diferentes independentes do acúmulo geral dos lipídios (Schweigert & Gottwald ,1999; Schweigert *et al*,2004). O leite e o ovo (Figura 4b), margarinas e óleos (Figura 4e) explicam, em parte, estes resultados.

Variações na composição do leite humano estão relacionados com fatores que interagem intrinsecamente. Fatores externos como o estágio de lactação, momento da coleta e hábitos dietéticos modulam o metabolismo materno endógeno da glândula mamária, tecido adiposo e metabolismo do fígado, e promovem mudanças no padrão do leite secretado (Scopesi *et al*, 2001).

Em países em desenvolvimento, a concentração de vitamina A do leite de transição para o maduro cai, pela metade, devido baixa ingestão de alimentos de origem animal. Entretanto, outros fatores podem contribuir incluindo baixa ingestão de gordura na dieta (necessária para a melhorar a absorção e utilização da vitamina A e os precursores de carotenóides), maior ingestão de fibra dietética, que pode reduzir a biodisponibilidade de carotenóides, infecções, que podem aumentar a demanda metabólica e deficiências de ferro e zinco (Ross; Harvey, 2003).

5.4 Adequação nutricional do leite materno

A amamentação exclusiva é recomendada até os seis meses de idade. Estudos recentes mostram que o consumo de leite materno em países desenvolvidos, como Estados Unidos, gira em torno de 700mL no primeiro mês evoluindo até em média de 854mL no sexto mês, com os maiores índices registrados na Austrália (1187mL) (WHO, 2002). Em países sub-desenvolvidos, esta média chega próximo a 562mL no primeiro mês até 804mL no sexto mês, com os menores índices nas Filipinas (336mL) e no Zaire (338mL) (WHO, 2002). É de todo desconhecido o volume de leite produzido por mães primíparas e multíparas por falta de metodologia confiável.

A ingestão de leite materno varia de acordo com as práticas da amamentação. A iniciação precoce da amamentação aumenta o sucesso e sobretudo a duração da amamentação (Ross; Harvey, 2003).

A produção de leite materno é influenciada por vários fatores. Em um estudo no Brasil, Borges e Philippi (2003) revelaram que a maioria das mulheres estudadas

(82,9%) considerou a produção de leite em quantidade suficiente para satisfazer a necessidade do bebê, revelando uma auto-estima e confiança maior da mãe em relação à amamentação.

Em seu trabalho, Gigante, Victora e Barros (2000) as mães com 20 anos ou mais e as multíparas amamentaram seus filhos por mais tempo do que o grupo das demais, sugerindo-se que a promoção do aleitamento materno seja também destinadas às mães primíparas.

Diferentemente dos humanos, a quantidade de leite que o bezerro ingere representa o que ele é capaz de consumir e não o que a mãe seria capaz de produzir (Mendonça *et al*, 2002). Marquis *et al* (2002) utilizou para mensurar o volume de leite ingerido pelo bebê, onde é feito pelo teste de pesagem, sendo a criança pesada antes e depois de cada mamada, durante 24 horas. Então, utilizaram uma balança digital de sensibilidade de 1g. Chapman *et al* (2001) também utilizou esta metodologia relatada e consideraram usual em pesquisas de lactogêneses. Entretanto, este é um método indireto para estimar a produção de leite (Mendonça *et al*, 2002).

Marquis *et al* (2002) mediu também, em 24 horas, a ingestão de colostro variando de 2 a 570g, e com as mães amamentando em até 20 vezes neste período. Nesse estudo, o acompanhamento do volume de leite produzido diariamente com as mães primíparas e multíparas ficou inviável devido a vários fatores como: falta de metodologia confiável, desgaste físico e emocional da mãe, disponibilidade de um profissional para coleta deste leite durante 24 horas e números elevados e sucessivos de mamadas que desgastaria a criança e a mãe.

Apesar destes dados de volume de leite consumido pelo recém-nascido serem de referência mundial (*WHO*), não existem dados oficiais da produção de leite materno no Brasil. Para adequação à realidade brasileira é de fundamental importância inclusive esta avaliação.

O Brasil, por ser considerado ainda um país em desenvolvimento, o consumo de leite materno pelo recém-nascido estaria próximo do valor anteriormente citado (562 mL). Considerando que a média global de concentração do retinol foi de 173µg/dL e do tocoferol 699µg/dL, atingiríamos um valor diário de 972.26µg e 3928.38µg para retinol e tocoferol, respectivamente. A *WHO* (2002) recomenda uma ingestão diária recomendada para crianças de 0-6 meses é de 375µg de vitamina A e 2700µg de vitamina E, isto representa cerca de 2.5 vezes mais da IDR (Ingestão Diária Recomendada) para vitamina A e 1.4 vezes para IDR de vitamina E do lactente. Durante os seis primeiros meses de vida, as crianças que consomem em torno de 300µg de vitamina A por dia, estocam no fígado em torno de 125µg por dia para prevenir sintomas clínicos de deficiência (Ross; Harvey, 2003).

O ponto de corte usado para o nível de vitamina A no leite materno de mães mal nutridas na ausência de qualquer intervenção para aumento no nível de vitamina A foi de 300µg/L, enquanto para mulheres bem nutridas foi de 700µg/L (Ross; Harvey, 2003). A partir desta classificação, todas as mães doadoras se enquadram no grupo de mães bem nutridas, pois as médias de retinol, nas três fases iniciais de lactogênese, foram superiores ao estabelecido por este autor.

A *WHO* (2002) recomenda que em países onde a deficiência de vitamina A é comum, as mães devem ser suplementadas logo após o nascimento do bebê para aumentar os níveis de vitamina A no leite materno.

6. CONCLUSÕES

- Existem diferenças mensuráveis e significativas nos níveis de retinol e tocoferol do leite, obtidos de doadoras primíparas e múltíparas;

- Parece haver uma tendência de redução nos níveis de tocoferol ao longo da lactação, tanto em primíparas como em múltíparas, enquanto para o retinol, esta redução foi menos acentuada;

- À medida que a lactação progride, há uma tendência de estabilização do leite materno, observado mediante redução na variabilidade nos teores das vitaminas, em distintas fases;

- O perfil do consumo de alimentos fontes de vitaminas A e E permitiram justificar apropriadamente os níveis encontrados destas vitaminas no leite.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, L.H.; HASKELL, M.; BENOIST, B. de; MARTINES, J.; GOODMAN, T. Vitamin A requirements of infant under six months of age. **Special issue: Vitamin A supplementation and the control of vitamin A deficiency**, v. 22, n. 3, p. 214-234, 2001.

AOAC. Official methods of analysis. Association of official analytical chemists. Vitamins and other nutrients. Deutsch, chap. 45, 19th ed. Washington, 1998.

BATHE, K.; CHEN, F.; BUSER, U.; DUDENHAUSEN, J.W.; SCHWEIGERT, F.J.; SCHUBERT, R.; FLACHOWSKY, G.; BITSCH, R.; JAHREIS, G. Effect of lactation phase on carotenoid concentration in human milk. **Vitamine und zusatzstoffe in der ernahrung von mensh und tier**. Symposium Jena-Thuringen, Germany. p. 124-133, 1999.

BLANCO, D.; FERNANDEZ, M.P.; GUTIERREZ, M.D. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in dairy products by liquid chromatography with a narrow-bore column. **Analyst**, v. 125, n. 3, p. 427-431, 2000.

BORGES, A.L.V; PHILIPPI, S.T. Opinião de mulheres de uma Unidade de Saúde da Família sobre a quantidade de leite materno produzido. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 11, n.3, p. 287-292, 2003.

CANFIELD, L.M.; GIULIANO, A.R.; NEILSON, E.M.; YAP, H.H.; GRAVER, E.J.; CUI, H.A.; BLASHILL, B.M. Beta-carotene in breast milk and serum is increased after a single beta-carotene dose. **American journal of clinical nutrition**, v. 66, n. 1, p. 52-61, 1997.

CHAPMAN, D.J; YOUNG, S. FERRIS, A.M. PÉREZ-ESCAMILLA, R. Impact of breast pumping on lactogenesis stage II after cesarean delivery: a randomized clinical trial. **Pediatrics**, v. 107, n. 6, June, 2001.

CHAWLA, R; KAUR, H. Plasma antioxidant vitamin status of periparturient cows supplemented with α -tocopherol and β -carotene. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, p. 279-285, 2004.

CHEN, QIUYAN; ROSS, CATHARINE A. Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells. **Experimental Cell Research**, v. 297, p. 68-81, 2004.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 4. ed: Editora da UNICAMP, 1990.

CORBELLA, G.M.J.; BIOSCA, M.T.; BARGALLÓ, A.I.C.; SABATER, M.C.L. Retinol and α -tocoferol in infant formulas produced in the EEC. **Food Chemistry**, v. 66, p. 221-226, 1999.

DE VRIES, J.W.; SILVERA, K.R. Determination of vitamins A (retinol) and E (alpha-tocopherol) in foods by liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC international**, v. 85, n. 2, p. 424-434, 2002.

DEBIER, C; POMEROY, P.P.; BARET, P.V., MIGNOLET, E.; LARONDELLE, Y. Vitamin E status and the dynamics of its transfer between mother and pup during lactation in grey seals (*Halichoerus grypus*). **Canadian Journal of Zoology**, v.80, n. 4, p.727-737, 2002.

DIMENSTEIN, R. SIMPLICIO, J.L.; RIBEIRO, K.D.S, MELO, I.L.P. Influência de variáveis socioeconômicas e de saúde materno-infantil sobre os níveis de retinol no colostro humano. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 6, p. 513-518, 2003.

ELDIN, A.K.; GÖRGEN, S.; PETTERSSON, J.; LAMPI, A.M. Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols comparison of different chromatographic columns. **Journal of chromatography A**, v. 881, p. 217-227, 2000.

EMEKLI, U.; TUNCER, S.; KABAKAS, F.; AYDIN, A.; ARINCI, A.; BILGIC, B.; HAKLAR, G. The effect of short-versus long-term administration of alpha tocopherol on the survival of random flaps in experimental diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 18, p. 249-257, 2004.

ENWONWU, CYRIL O.; PHILLIPS, RESHMA S. Increased retinol requirement in acute measles infection in children: an hypothesis on role of hypercortisolemia. **Nutrition Research**, v. 24, p. 223-227, 2004.

ESCRIVÁ, A.; ESTEVE, M.J.; FARRÉ, R.; FRÍGOLA, A. Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 947, p. 313-318, 2002.

EUCLYDES, M. P. **Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação adequada**. Viçosa, 1997.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2º ed. Editorial Acribia, Zaragoza – Espana, 2000.

GAZZOLO, D; BRUSCHETTINI, M; LITUANIA, M; SERRA, GIOVANNI; SANTINI, P; MICHETTI, F. Levels of S100B protein are higher in mature human milk than in colostrum and milk-formulae milks. **Clinical Nutrition**, v. 23, p. 23-26.

GIGANTE, D.P.; VICTORA, C.G., BARROS, F.C. Nutrição maternal e duração da amamentação em uma coorte de nascimento de Pelotas, RS. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n.3, p. 259-265, 2000.

GÓES, H.C.A.; TORRES, A.G.; DONAGELO, C.M.; TRUDGO. Nutrient composition of banked human milk in Brazil and influence of processing on zinc distribution in milk fractions. **Nutrition**. v. 18, p. 590-594, 2002.

GOMIS, D.B.; FERNÁNDEZ, M.P.; ALVAREZ, M^a.D.G. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography.

Journal of chromatography A, v. 891, p. 109-114, 2000.

GONG, B.Y.; HO, J.W. Simultaneous separation and detection of ten common fat-soluble vitamins in milk. **Journal of liquid chromatography and related technologies**, v. 20, n. 15, p. 2389-2397, 1997.

GOSSAGE, C.; DEYHIM, M.; MOSER, V.P.B.; DOUGLAS, L.W.; KRAMER, T.R. Effect of beta-carotene supplementation and lactation on carotenoid metabolism and mitogenic T lymphocyte proliferation. **American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 4, p. 950-955, 2000.

GOSSAGE, C.; DEYHIM, M.; YAMINI, S.; DOUGLAS, L.W.; MOSER, V.P.B. Carotenoid composition of human milk during the first month postpartum and the response to beta-carotene supplementation **American journal of clinical nutrition**, v. 76, n. 1, p. 193-197, 2002.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10^o ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

HAVEMOSE, M. S.; WEISBJERG, M. R; BREDIE, W.L.P.; NIELSEN, J.H. Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. **International Dairy journal**, v. 14, p. 563-570, 2004.

HEUDI, O; TRISCONI, M.J.; BLAKE, C.J. Simultaneous quantification of Vitamins A, D₃, and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1022, p. 115-123, 2004.

HEWAVITHARANA, A.K. BRAKEL, A.S.V. A rapid saponification procedure for the simultaneous HPLC determination of the natural levels of vitamins A, E and beta-carotene in milk. **Milchwissenschaft**, v. 53, n. 1, p. 11-15, 1998.

HEWAVITHARANA, A.K.; BRAKEL, A.S.V; HARNETT, M. Simultaneous liquid chromatographic determination of vitamins A, E and β -carotene in common dairy foods. **International dairy journal**, v. 6, p. 613-624, 1996.

HURTADO, S.A.; RODRIGUEZ, S.N.; NOGUÉS, M.T.V.; FONT, A.M. Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatograph**, v. 778, p. 243-246, 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística do Registro Civil**. v. 27, p. 233, 2000.

JACKSON, J.G.; JANSZEN, D.B.; LONNERDAL, B.; LIEN, E.L.; PRAMUK, KP.; KUHLMAN, C.F. A multinational study of α -lactalbumin concentrations in human milk. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p. 517-521, 2004.

KHACHIK, F.; SPANGLER, C.J.; SMITH, J.C.; CANFIELD, L.M.; STECK, A.; PFANDER, H. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. **Analytical chemistry**, v. 69, n. 10, p. 1873-1881, 1997.

KOLETZKO, B.; RODRIGUEZ-PALMERO, M.; DEMMELMAIR, H.; FIDLER, N.; JENSEN, R.; SAUERWALD, T. Physiological aspects of human milk lipids. **Early human development**. v. 65, p. S3-S18, Suppl., 2001.

LAMBERT, W.; SCOTT, K.J. Evolutions in the analysis of fat-soluble vitamins and carotenoids. **International journal vitamins and nutrition research**, v. 66, p. 270-297, 1996.

LI, H.B.; CHEN, F. Simultaneous determination of twelve water-and fat-soluble vitamins by high-performance liquid chromatography with diode array detection. **Chromatographia**, v. 54, n. 3-4, p. 270-273, 2001.

LLEDÓ, P.R.; VERA, S.; ANDRÉS, M.P.S. Determination of vitamins A and E in milk samples by fluorescence in micellar media. **Frenesius journal of analytical chemistry**, v. 369, p. 91-95, 2001.

LOW, S.; BATISTA FILHO, M.; SOUZA, A.I. **Assistência pré-natal no Estado de Pernambuco**. 2º ed., Bagaço, Recife, p. 64., 2001.

MACIAS, C.; SCHWEIGERT, F.J. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. **Annals of nutrition and metabolism**, v. 45, n.2, p. 82-85, 2001.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10º ed., Rocca, São Paulo, p.1157, 2002.

MANZI, P.; PANFILI, G.; PIZZAFERRATO, L. Normal and reversed-phase HPLC for more complete evaluation of tocopherols, retinols, carotenes and sterols in dairy products. **Chromatographia**, v. 43, n. 1-2, p. 89-93, 1996.

MARTINEZ, R.M.; ORTEGA, R.M.; ANDRES, P. Vitamin A concentration in maternal milk: the effect of intake and serum levels of vitamin A during the third trimester of pregnancy. **Medicina clinica Barcelona**, v. 109, n. 15, p. 573-576, 1997.

MARQUIS, G.S.; PENNY, M.E.; DIAZ, J.M.; MARIN, M. Postpartum consequences of a overlap of breastfeeding and pregnancy: reduced breast milk intake and growth during early infancy. **Pediatrics**, v. 109, n.4, 1-8, April, 2002.

McMANAMAN, JAMES L.; NEVILLE, MARGARET C. Mammary physiology and milk secretion. **Advanced Drug Delivery reviews**, v. 55, P. 629-641, 2003.

MENDONÇA, G; PIMENTEL; M.A.; CARDELLINO, R.A.; OSÓRIO, J.C.S. Produção de leite em primíparas de bovinos Hereford e desenvolvimento ponderal de

terneiros cruzas taurinos e zebuínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 467-474, 2002.

MENDOZA, B.R.; PONS, S.M.; BARGALLÓ, A.I.C.; SABATER, M.C.L. Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitamins A and E in infant formulas. **Journal of Chromatography A**, v. 1018, p. 197-202, 2003.

MIQUEL, E; ALEGRIA, A.; BARBERÁ, R; FARRÉ, R; GONZALO, C; Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulas during storage. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 1003-1011, 2004.

NASCIMENTO, MARIA B. R.; ISSLER; HUGO. Breastfeeding: Making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 58, n. 1, p. 49-60, 2003.

OLAFSDOTTIR, A.S.; WAGNER, K.H.; THORSDDOTTIR, I.; ELMADFA, I. Fat-soluble vitamins in the maternal diet, influence of cod liver oil supplementation and impact of the maternal diet on human milk composition. **Annals of nutrition and metabolism**, v. 45, n. 6, p. 265-272, 2001.

OMS. Vitamina "A" na gestação e lactação. Recomendações e relatório de uma consultoria. **Organização Mundial de Saúde**. Recife, 2001.

ORTEGA, R.M.; LÓPEZ-SOBALER, A.M.; ANDRÉS, P; MARTÍNEZ, R.M.; QUINTAS, M.E.; REQUEJO, A.M. Maternal vitamin E status during the third trimester of pregnancy in Spanish women: influence on breast milk vitamin E concentration. **Nutrition Research**, v. 10, n. 1, p. 25-36, 1999.

PAIXÃO, J.A.; CAMPOS, J. M. Determination of fat soluble vitamins by Reversed-phase HPLC coupled with UV detection: A guide to the explanation of intrinsic variability. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 26, n. 4, p. 627-650, 2003.

PAIXÃO, J.A.; STAMFORD, T.L.M. Lacteal matrices. A single guide for extraction and quantification of fat-soluble vitamins. **Journal of liquid chromatography and related technologies**, v. 25, n. 2, p. 217-239, 2002.

PAIXÃO, J.A.; STAMFORD, T.L.M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos - Uma abordagem analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 96-105, 2004.

PARADOWSKA, S.; TRAFALSKA, E. GRZYBOWSKI, A. The realization of requirement of selected vitamins and minerals in adolescent diet. **Nowa-medycyna**, v. 7, n. 108, p. 19-20, 2000.

PAULO, M.G.; MARQUES, H.M.; MORAIS, J.A.G.; ALMEIDA, A.J. An isocratic LC method for the simultaneous determination of vitamins A, C, E and β -carotene. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 399-406, 1999.

PO, E.S.M.; HO, A.W.; GONG, B.Y. Simultaneous chromatographic analysis of eight fat-soluble vitamins in plasma. **Journal biochemistry methods**. v. 34, p. 99-106, 1997.

PONS, S.M.; BARGALLO, A.C.; FOLGOSO, C.C.; SABATER, M.C.L. Triacylglycerol composition in colostrums, transitional e mature human milk. **European journal of clinical nutrition**, v. 54, n. 12, p. 878-882, 2000.

QIAN, H. ;SHENG, M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D₂ in animal feeds by on-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. **Journal of chromatography**, v. 825, p. 127-133, 1998.

RICE, A.L.; STOLTZFUS, R.J.; FRANCISCO, A. de; KJOLHEDE, C.L. Evaluation of serum retinol, the modified-relative-response ratio, and breast-milk vitamin A as indicators of response to postpartum maternal vitamin A supplementation. **American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 3, p. 799-806, 2000.

RODRIGO, N; ALEGRIA, A. BARBERA, R.; FARRE, R. High-performance liquid chromatographic determination of tocopherols in infant formulas. **Journal of chromatography A**, v. 947, n.1, p. 97-102, 2002.

ROSS, J.S.; HARVEY, P.W.J. Contribution of breastfeeding to vitamin A nutrition of infants: a simulation model. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, n.2, 80-86, 2003.

SCHWEIGERT, F.J.; BATHE, K.; CHEN, F.; BÜSCHER, U.; DUDENHAUSEN, J.W. Effect of the stage of lactation in human on carotenoid levels in milk, blood plasma and plasma lipoprotein fractions. **European Journal Nutrition**, v.43, p. 39-44, 2004.

SCHWEIGERT, F.J.; GOTTWALD, C. Effect of parturition on levels of vitamins A and E and of beta-carotene in plasma and milk of mares. **Equine veterinary journal**, v. 31, n. 4, p. 319-323, 1999.

SCOPESE, F; CIANGHEROTTI, S.; LANTIERI, P.B.; RISSO, D.; BERTINI, I.; PEDROTTI, A. Maternal dietary PUFAs intake and human milk content relationships during the first month of lactation. **Clinical Nutrition**, v. 20, n.5, p. 393-397, 2001.

SEGURA, S. A.; ALQUINTA, R.C. Vitaminas A y E en la leche maternal: ¿es necesaria la suplementación en niños prematuros? **Revista Esp. Pediatría**, v. 49, n. 4, p. 285-293, 1993.

SMITH, D.E.; BERGE, C.B. The effect of two antioxidants on the light stability of vitamin A in fluid milk. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 10, p. 551-554, 1997.

STROBEL, M.; HEINRICH, F.; BIESALSKI, H.K. Improved method for rapid determination of vitamin A in small samples of breast milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography – A**, v. 898, n. 2, p. 179-183, 2000.

TANUMIHARDJO, S.A.; PENNISTON, K.L. Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations. **Journal of lipid research**, v. 43, n. 2, p. 350-355, 2002.

THEIL, P. K.; JORGENSEN, H.; JAKOBSEN, K. Energy and protein metabolism in lactating sows fed two levels of dietary fat. **Livestock Production Science**, v. 89, p. 265-276, 2004.

URUAKPA, F.O.; ISMOND, M.A.H.; AKOBUNDU, E.N.T. Colostrum and its benefits: a review. **Nutrition Research**, v. 22, p. 755-767, 2002.

VÄÄNÄNEN, P.S.; OLLILAINEN, V.; MATTILA, P.; LEHIKONEN, K.; MÖLSA, E.S.; PIIRONEN, V. Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction. **Food chemistry**, v. 71, p. 535-543, 2000.

VEGA-LÓPEZ, S; KAUL, N; DEVARAJ, S; CAI, R.Y.; GERMAN, B.; JIALAL, I. Supplementation with w3 polyunsaturated fatty acids and all-rac alpha-tocopherol alone in combination failed to exert an anti-inflammatory effect in human volunteers. **Metabolism**, v. 53, n 2, p. 236-240, 2004.

WEIDERPASS, E.; BARROS, F.C.; VICTORA, C.G.; TOMASI, E.; HALPERN, R. Incidência e duração da amamentação conforme o tipo de parto: estudo longitudinal no Sul do Brasil. **Revista Saúde Pública**, v.32, n. 3, p.225-231, 1998.

WIELINSK, S.; OLSZANOWSKA, A. Simultaneous determination of retinol acetate, retinol palmitate, cholecalciferol, α -tocopherol acetate and alphacalcidol in capsules by non-aqueous reversed-phase HPLC and column backflushing. **Chromatographia**. v. 50, n. 1-2, p. 109-112, 1999.

WILLIAMS, S. R. **Fundamentos de nutrição e dietoterapia**. 6^o ed., Artes Médicas, 1997.

WOLTERS, MAIKE; HICKSTEIN, MIRJA; FLINTERMANN, ANKE; TEWES, UWE; HAHN, ANDREAS. Cognitive performance in relation to vitamin status in health elderly German women - the effect of 6-month multivitamin supplementation. **Preventive Medicine**. Article in press. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life. Geneva, 2002.

YAMAUCHI, R; SOUTHWELL-KEELY, P; SUARNA, C; RAY, S; RAFTERY, M; CYNCHI, O; STOCKER, R. Characterization of the oxidation products of BO-653 formed during peroxy radical-mediated oxidation of human plasma. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 32-40, 2005.

YANG, D.Y; CHANG, C.J; PEH, H.C; CHEN, M.T. Anti-peroxidation effects of vitamin E on low density lipoprotein and milk fat globule membrane of lactating goats: in vivo versus metal ion challenge in vitro. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139 part A, p. 11-20, 2004.

ZAMARREÑO, M.M.D.; PEREZ, A.S.; RODRIGUEZ, M.C.; PEREZ, G.; MENDEZ, J.H. Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection. **Talanta**, v. 43, p. 1555-1563, 1996.

8. ANEXOS

ANEXO A

QUESTIONÁRIO DE MÃES DOADORAS EM BANCOS DE LEITE

1. Identificação pessoal

Nome:	Registro:
End: Tel:	Data hoje:
Bairro: Cidade:	Idade:
Ponto de referência:	Peso:
Grau de instrução: Estado civil:	Altura:
Hospital:	Nasc. Bebê:
Tipo de parto: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Cesariana <input type="checkbox"/> Fórceps <input type="checkbox"/> Outro	Sexo/nome bebê:

2. Dados da mãe

Primípara: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Nº filhos+ RN: <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> +5	Exames clínicos:
Abortos: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Nº abortos: <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> +4	Htc:
Prematuro: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Nº prematuros: <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> +4	Hb:
Diabetes: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Medicam:	Glic:
Hipertensão: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Medicam:	CT:
Cardiopatia: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Medicam:	Tg:
Outra patolog: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Qual:	Ptn:
Bebe: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Freq:	Fuma: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Freq:	

3. Frequência de consumo alimentar na gestação

Carnes bovina, aves, peixes	Nunca <input type="checkbox"/> Às vezes <input type="checkbox"/> 1x/sem <input type="checkbox"/> 2x/sem <input type="checkbox"/> 3+x/sem <input type="checkbox"/> diar. <input type="checkbox"/>
Fígado, vísceras	Nunca <input type="checkbox"/> Às vezes <input type="checkbox"/> 1x/sem <input type="checkbox"/> 2x/sem <input type="checkbox"/> 3+x/sem <input type="checkbox"/> diar. <input type="checkbox"/>
Leite, queijo, ovo	Nunca <input type="checkbox"/> Às vezes <input type="checkbox"/> 1x/sem <input type="checkbox"/> 2x/sem <input type="checkbox"/> 3+x/sem <input type="checkbox"/> diar. <input type="checkbox"/>
Margarina, manteiga, óleo	Nunca <input type="checkbox"/> Às vezes <input type="checkbox"/> 1x/sem <input type="checkbox"/> 2x/sem <input type="checkbox"/> 3+x/sem <input type="checkbox"/> diar. <input type="checkbox"/>
Cenoura, pimentão, abóbora	Nunca <input type="checkbox"/> Às vezes <input type="checkbox"/> 1x/sem <input type="checkbox"/> 2x/sem <input type="checkbox"/> 3+x/sem <input type="checkbox"/> diar. <input type="checkbox"/>

Observações:

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu _____ estou ciente e fui orientada sobre a importância da participação nesta pesquisa e autorizo a coleta de leite colostro, de transição e maduro, bem como de meus dados pessoais para a mesma.

Assinatura da responsável

Local: _____

Data : _____

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.