

DANIELLE SOARES BEZERRA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM
MEGADOSES DE VITAMINA A, ADMINISTRADAS EM
DIFERENTES INTERVALOS, NAS CONCENTRAÇÕES DE
RETINOL NO LEITE MATERNO**

RECIFE - PE
2015

Danielle Soares Bezerra

**Efeito da suplementação materna com megadoses de vitamina A,
administradas em diferentes intervalos, nas concentrações de retinol
no leite materno**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutora em Nutrição.

Orientadora: Mônica Maria Osório de Cerqueira

Coorientador: Roberto Dimenstein

RECIFE - PE
2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

B574e Bezerra, Danielle Soares.
Efeito da suplementação materna com megadoses de vitamina A, administradas em diferentes intervalos, nas concentrações de retinol no leite materno / Danielle Soares Bezerra. – Recife: O autor, 2015.
122 f.: il.; tab.; quadr.; 30 cm.

Orientadora: Mônica Maria Osório de Cerqueira.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Deficiência de vitamina A. 2. Suplementos dietéticos. 3. Período pós-parto. 4. Estudos de intervenção. 5. Leite materno. I. Cerqueira, Mônica Maria Osório de (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-105)

Danielle Soares Bezerra

**Efeito da suplementação materna com megadoses de vitamina A,
administradas em diferentes intervalos, nas concentrações de retinol no leite
materno**

Tese aprovada em: 20 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Roberto Dimenstein, Doutor em Bioquímica da Nutrição (UFRN)

Prof^a. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira, Doutora em Nutrição (UFPE)

Prof^a. Juliana Souza Oliveira, Doutora em Nutrição (UFPE)

Prof^o. Emerson Peter da Silva Falcão, Doutor em Ciências Biológicas (UFPE)

Prof^a. Héryka Myrna Maia Ramalho, Doutora em Ciências Farmacêuticas (UNP)

RECIFE - PE
2015

Dedico esta tese a Deus e à minha família que (cada um ao seu modo) me dão inspiração, coragem e fôlego para que eu possa alimentar essa vontade de seguir em busca de outras respostas que não as já vividas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e me amparar em todos os momentos da minha vida!

Aos meus amados pais Antônio Costa Bezerra e Marli Soares Bezerra, à minha avó paterna Maria Costa Bezerra (*in memoriam*), aos meus irmãos Shirleide Soares Bezerra Araújo, Elaine Cristina Soares Bezerra Ataíde e Gelson Soares Bezerra e aos meus três lindos sobrinhos Stephanny Kelly Soares Araújo, Vinícios Soares Ataíde e Lara Maria Soares Araújo, meus melhores e maiores presentes de vida!

Ao meu amado e admirável marido, Marcus Vinícius Galvão, pelo amor, companheirismo e compreensão tão explicitamente demonstrados durante todo o tempo em que estamos juntos e ainda mais durante o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Mônica Maria Osório, minha orientadora, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e compreensão à mim dispensados ao longo desta jornada. Além de grande profissional, descobri um ser humano admirável.

Ao professor Roberto Dimenstein, meu co-orientador, pela confiança e credibilidade novamente depositadas desde o momento em que este trabalho ainda era apenas um anseio.

À professora Florisbela Campos, pelas sábias e enriquecedoras contribuições repassadas gentilmente durante momentos cruciais deste trabalho.

Aos professores presentes na banca examinadora desta tese, pela disponibilidade e relevantes contribuições antecipadamente reconhecidas.

À todas as mulheres e filhos que voluntariamente contribuíram para o fortalecimento da ciência e que sem saber também ajudaram no crescimento de um ser humano...

À todos os alunos da Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi-UFRN que de algum modo auxiliaram na execução deste estudo, especialmente à Cállysson Pinheiro, Camila Valdejane de Souza, Cleidejane Salustino, Cleidijane Antero, Cynthia Lorena de Araújo, Josefa Muriele Marinho, Joycimara de Medeiros, Juliana de Araújo, Licaônia de Souza, Luciana Clementino, Marcos Vinícius Cavalcante, Rayane Larissa de Araújo, Sahra Brena Libanio, Tayane Sahara de Oliveira e Vinícius Müller Santos pelo relevante envolvimento nas coletas de dados.

Ao professor Roberto Dimenstein, à Karla Danielly da Silva Ribeiro, Mayara Santa Rosa Lima, Jeane Franco Pires e todos os demais integrantes do Laboratório de Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição da UFRN (LABAN-UFRN), pelo apoio e por toda a contribuição que deram nas análises bioquímicas do material biológico usado nesta pesquisa.

Aos meus amigos e colegas, pelos momentos de descontração proporcionados e pelo incentivo e apoio constantes durante do o tempo do Doutorado.

Ao Hospital Universitário Ana Bezerra e todos os que o fazem, por permitirem que suas instalações fossem cenário para a realização de um grande sonho.

À Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade que me foi dada para o alcance de um grande e desejado objetivo.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte, especialmente à Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi-FACISA-UFRN, pelo entendimento de que este trabalho é relevante para, não apenas um de seus docentes, mas também para a própria instituição, bem como para o público materno-infantil e o município de Santa Cruz-RN.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são” (Aristóteles)

Depois...

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê” (Arthur Schopenhauer)

Mesmo assim...

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota” (Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

Este estudo avaliou o estado nutricional de vitamina A (VA) de mulheres e seus recém-nascidos, verificou a associação entre o retinol do soro materno, do cordão umbilical e do colostro, bem como a relação do retinol destas amostras biológicas com variáveis sócio-demográficas e obstétricas. Além disso, o presente estudo avaliou o efeito de diferentes protocolos de suplementação materna com megadoses de VA administradas pós-parto, na concentração de retinol no leite materno ao longo de 12 semanas após o parto. Em um hospital público de um município do Nordeste do Brasil, durante o *baseline* (0h), foram coletadas informações socioeconômicas e obstétricas, bem como amostras de soro materno, de soro de cordão umbilical e de colostro de 65 pares de mães e recém-nascidos. As mulheres foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos de intervenção (G200 0h, G200 4S, G400 24h e G400 4S) e suplementadas com megadoses de VA (200.000 UI ou 400.000 UI) em diferentes momentos do puerpério (0h, 24h, 1ª semana, 4ª semana pós-parto). Outras 4 alíquotas de leite materno foram coletadas 24h, 1, 4 e 12 semanas após o parto. As concentrações de retinol foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Métodos de estimação adequados e testes estatísticos foram aplicados para as variáveis discretas e contínuas. A técnica Generalized Estimed Equation (GEE) foi usada para avaliar as diferenças nas concentrações de retinol no leite materno ao longo do tempo. A prevalência de deficiência de vitamina A (DVA) materna foi de 21,5% (IC 95%: 11.5% - 31.5%) e 13,8% (IC 95%: 5.4% - 22.2%) com base no soro materno e no colostro, respectivamente. Entre os recém-nascidos, 41,5% (IC 95%: 29.3% - 53.5%) tinham baixo status de VA no soro do cordão umbilical. Na população investigada, a DVA em mães é comum e associada ao nascimento de infantes com baixas concentrações de retinol no soro de cordão umbilical. A paridade e a escolaridade maternas estiveram relacionadas ao status de VA materno. A suplementação materna de VA, quando administrada no pós-parto imediato, proporcionou incremento das concentrações de retinol no colostro. As concentrações de retinol no leite materno nos quatro grupos foram semelhantes ao final de 12 semanas pós-parto ($p > 0,05$). Os resultados apontam para a necessidade da adoção de medidas de combate e controle da DVA nessa população, contudo, alterações nos protocolos de suplementação quanto ao número de doses e/ou momento de administração não ofereceram benefício adicional às concentrações de retinol no leite maduro.

Palavras-chave: Deficiência de vitamina A. Suplementos dietéticos. Período pós-parto. Estudo de intervenção. Leite materno. Cromatografia líquida de alta eficiência.

ABSTRACT

This study evaluated the nutritional status of vitamin A (VA) in women and their newborns and determine the association between retinol in the maternal serum, umbilical cord blood and colostrum milk, as well as the relationship between retinol concentrations in the biological samples and socio-demographic and obstetric variables. Furthermore, this study evaluated the effect of some different maternal supplementation protocols with megadoses of vitamin A at postpartum, in the breast milk retinol concentrations over a period of 12 weeks. In a public hospital located in a Brazilian Northeast city, at the baseline (0h), were collected socioeconomic and obstetric information, as well as samples of maternal serum, umbilical cord serum and colostrum of 65 pairs of mothers and newborns. The women were randomized into four intervention groups (G200 0h, G200 4S, G400 24h and G400 4S) and were supplemented with megadoses of VA (200,000 IU or 400,000 IU) at different times postpartum (0h, 24h, 1, and 4 weeks postpartum). Four other aliquots of breast milk were collected at times 24h, 1, 4 and 12 weeks after delivery. Retinol concentrations were analyzed by high performance liquid chromatography. Appropriate statistical methods were used to evaluate the differences between the studied variables. The Generalized Estimation Equation (GEE) assessed the different retinol levels in the breast milk over time. The prevalence of maternal vitamin A deficiency (VAD) was 21.5% (95% CI: 11.5% - 31.5%) and 13.8% (95% CI: 5.4% - 22.2%) based on maternal serum and colostrum, respectively. Among the newborns, 41.5% (95% CI: 29.3% - 53.5%) had low VA status in cord serum. In this population, VAD mothers is common and this problem is associated with delivering a low status of VA in newborns. Maternal parity and educational level were related with the maternal VA status. When administered immediately after delivery, maternal supplementation of VA provided increment of retinol concentrations in colostrum. Retinol concentrations in breast milk in the four groups were similar at the end of 12 weeks postpartum ($p > 0.05$). The findings pointed out the need to adopt control actions against VAD in this population, although, changes in the supplementation protocols regarding on the number of doses and/or time of administration offered no additional benefits to retinol concentrations in mature milk.

Keywords: vitamin A deficiency, dietary supplements, postpartum period, intervention study, breast milk, high performance liquid chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura	Quadro 1. Recomendações para ingestão diária de vitamina A.....	23
Revisão de Literatura	Quadro 2. Esquema para administração de vitamina A em crianças e puérperas.....	33
Metodologia	Quadro 3. Grupos de intervenção e esquema de suplementação materna com vitamina A.....	39
Revisão de Literatura	Figura 1. Ciclo dos fatores causais das das doenças por deficiência de vitamina A (DDVA).....	26
Material e Métodos	Figura 2. Esquema de distribuição dos partícipes, momentos das coletas (sangue e leite) e de intervenção.....	41
Resultados: Artigo II	Figure 1. Participant recruitment, distribution, and follow-up flowchart.....	98
Resultados: Artigo II	Figure 2. Intergroup assessment of breast milk retinol levels by follow-up time, Santa Cruz-RN-Brazil (2012-2014).....	103

LISTA DE TABELAS

Resultados: Artigo I	Table 1. Socio-demographic and obstetric characteristics of mothers and newborns attended in a public hospital in Santa Cruz-RN, Brazilian Northeast (2012-2013).....	70
Resultados: Artigo I	Table 2. Retinol concentrations in the colostrum, maternal serum and serum of the newborn (umbilical cord) attended in a public hospital in Santa Cruz-RN, Brazilian Northeast (2012-2013).....	72
Resultados: Artigo I	Table 3. Association between nutritional status of vitamin A of the mothers and newborn attended in a public hospital in Santa Cruz-RN, Brazilian Northeast (2012-2013).....	73
Resultados: Artigo I	Table 4. Retinol profile in maternal serum, newborn serum (umbilical cord) and colostrum, according to socio-demographic and obstetric characteristics of mothers and newborns attended in a public hospital in Santa Cruz, Brazilian Northeast (2012-2013)...	74
Resultados: Artigo II	Table 1. Characteristics of the study women and infants, Santa Cruz-RN-Brazil (2012-2014).....	99
Resultados: Artigo II	Table 2. Predictive model for the concentration of retinol after intervention and control of maternal variables.....	101
Resultados: Artigo II	Table 3. Intragroup assessment of the mean retinol levels in breast milk ($\mu\text{mol/L}$) in different follow-up times, Santa Cruz-RN-Brazil (2012-2014).....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	Adequate intake
ANOVA	Análise de variância
AR	Ácido retinóico
ARAT	Acil coenzima A retinol aciltransferase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CRBP	Celular Retinol Binding Protein
DDVA	Doenças por deficiência de vitamina A
DRI	Dietary Reference Intakes
DVA	Deficiência de vitamina A
GEE	Generalized Estimed Equation
G200(0H)	Grupo de mulheres que recebeu 200.000 UI de vitamina A, por via oral, no pós-parto imediato
G200(4S)	Grupo de mulheres que recebeu 200.000 UI de vitamina A, por via oral, na 4ª semana pós-parto
G400(24H)	Grupo de mulheres que recebeu 200.000 UI de vitamina A, por via oral, no pós-parto imediato + 200.000 UI, 24 horas após a 1ª suplementação.
G400(1S)	Grupo de mulheres que recebeu 200.000 UI de vitamina A, por via oral, no pós-parto imediato + 200.000 UI, 1 semana após a 1ª suplementação
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HUAB	Hospital Universitário Ana Bezerra
IG	Idade gestacional
IMC	Índice de Massa Corporal
IOM	Institute of Medicine
IVACG	International Vitamin A Consultative Group
LABAN	Laboratório de Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição
LRAT	Lecitina-retinol aciltransferase
MRDR	Teste de resposta relativa à dose modificado

OMS	Organização Mundial da Saúde
RAE	Retinol Activity Equivalents
RBP	Retinol Binding Protein
RDA	Recommended Dietary Allowance
RDR	Teste de resposta relativa à dose
RJ	Rio de Janeiro-Brasil
RN	Rio Grande do Norte-Brasil
+S30DR	Teste de resposta sérica de 30 dias
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TTR	Transtirretina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UI	Unidades Internacionais
UL	Tolerable Upper Intake Level
USA	United States of America
VA	Vitamina A
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory
VLDLs	Very Low Density Lipoprotein

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 NOMENCLATURA E FONTES DIETÉTICAS DA VITAMINA A.....	19
2.2 ABSORÇÃO, TRANSPORTE E ASPECTOS METABÓLICOS.....	20
2.3 FUNÇÕES DA VITAMINA A.....	21
2.4 REQUERIMENTOS DE INGESTÃO DE VITAMINA A.....	22
2.5 DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A.....	25
2.5.1 Fatores etiológicos.....	25
2.5.2 Epidemiologia e impacto na saúde.....	27
2.5.3 Indicadores diagnósticos.....	28
2.5.4 Estratégias de intervenção.....	29
2.5.4.1 Suplementação materno-infantil no Mundo.....	30
2.5.4.2 Suplementação materno-infantil no Brasil.....	32
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 DESENHO, POPULAÇÃO E LOCAL DO ESTUDO.....	36
4.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	36
4.3 TAMANHO DA AMOSTRA.....	36
4.4 CAPTURA DAS PARTÍCIPES E COLETA DE DADOS.....	37
4.5 MODELO DE INTERVENÇÃO.....	38
4.6 DADOS BIOQUÍMICOS.....	41
4.6.1 Coleta de material biológico.....	41
4.6.2 Extração do retinol.....	42

4.6.3 Condições cromatográficas e quantificação do retinol.....	43
4.6.4 Precisão e exatidão dos métodos.....	44
4.6.5 Classificação do estado nutricional de vitamina A.....	44
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 ARTIGO I - Vitamin A deficiency and associated factors in the mother-newborn pairs..	47
5.2 ARTIGO II - Effect of maternal supplementation of vitamin A given at differen intervals on breast milk levels of retinol.....	76
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
REFERÊNCIAS.....	106
APÊNDICE.....	114
ANEXOS.....	120

1 APRESENTAÇÃO

A deficiência de vitamina A (DVA) é um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e por este motivo alguns países têm implementado a suplementação de grupos de risco com vitamina A (VA) como medida terapêutica e profilática (WHO/UNICEF/IVACG, 1997; IVACG, 2002; WHO, 2009; BRASIL, 2013). Contudo, vários estudos mostraram que a suplementação materna no pós-parto imediato com única megadose de VA (200.000 UI), anteriormente recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), parece não assegurar níveis adequados de VA ao longo da lactação, podendo, a carência de VA estar presente nas formas marginais, mesmo nas crianças em aleitamento materno exclusivo. Diante disso, foi sugerido que uma dose maior poderia fornecer um benefício prolongado (RICE et al., 1999; BAHL et al., 2002; SOMMER, DAVIDSON, 2002).

Nesse contexto, o *International Vitamin A Consultative Group* (IVACG) temporariamente recomendou que a suplementação materna fosse administrada através de 400.000 IU de VA dividida em duas doses de 200.000 UI com intervalo mínimo de 24 horas entre elas, e máximo de até 6 semanas pós-parto (SOMMER, DAVIDSON, 2002). No entanto, pesquisas que avaliaram os efeitos dessa intervenção não comprovaram benefícios adicionais quanto às concentrações de retinol no leite, sangue materno ou sangue de infantes, tampouco no estado de saúde materno-infantil quando a dupla dose foi comparada à dose única (IDINDILI et al., 2007; DARBOE et al., 2007; BEZERRA et al., 2010).

Embora ambas as posologias (dose única ou dupla) já tenham sido investigadas, a existência de estudos que objetivem encontrar um possível intervalo de tempo ótimo para a dupla dosagem de VA administrada às mães no pós-parto, e que permitam avaliar o impacto desse regime de suplementação nas concentrações de VA no leite materno, ainda são considerados escassos e por isso se fazem necessários para completa investigação de suas potencialidades.

Ademais, segundo a OMS (2013a), também são necessárias pesquisas que investiguem os efeitos da megadose única (200.000 UI) na concentração de retinol no leite materno, quando esta for administrada semanas após o parto, em comparação à suplementação realizada no pós-parto imediato.

Assim, torna-se relevante verificar se o momento de administração de alta dose (única e dupla) de VA pode aumentar a efetividade da suplementação materna com relação ao seu impacto na concentração de retinol no leite materno.

Diante das lacunas existentes quanto à eficácia da suplementação materna de VA e as diferenças entre os regimes de suplementação adotados por diversas populações, qual dos protocolos já sugeridos para a suplementação materna de VA no pós-parto seria capaz de incrementar significativamente as concentrações de retinol no leite materno? A suplementação materna com dupla megadose de VA (200.000 UI + 2000.000 UI = 400.000 UI) administrada como 1 semana de intervalo entre as dosagens será vantajosa quando comparada à aplicação de dupla megadose com intervalo de 24h entre as dosagens, bem como à administração de única megadose (200.000 UI) no pós-parto imediato ou em quatro semanas após o parto?

Tais elucidações contribuiriam com uma maior objetividade quanto aos aspectos relacionados à suplementação materna de VA, ajudando na formulação de estratégias de intervenção apoiadas por evidências. Essas questões tornam-se especialmente importantes no Brasil, onde a aplicação de megadoses de VA no pós-parto continua a ser recomendada como uma estratégia potencialmente promissora para a prevenção e controle da DVA no binômio mãe-filho, especialmente em áreas de risco como a região Nordeste do país (BRASIL, 2013).

Nesse contexto e na expectativa da obtenção de respostas para as questões condutoras, o presente trabalho objetivou avaliar o impacto dos protocolos de suplementação materna quanto à magnitude do incremento das concentrações de retinol no leite materno durante as primeiras 12 semanas pós-parto, além de diagnosticar o estado nutricional de VA dos pares mãe-filho assistidos no Hospital Universitário Ana Bezerra (HUAB-UFRN), localizado no Rio Grande do Norte.

Para isso, foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), alíquotas de soro materno e de cordão umbilical coletadas durante o parto, além de alíquotas de leite colostro, leite de transição e leite maduro obtidas no decorrer das 12 primeiras semanas de lactação.

Essa investigação é apresentada no formato de tese onde estão reunidos, um capítulo de revisão de literatura sobre aspectos relacionados à “vitamina A” e à “deficiência de vitamina A” e dois artigos científicos originais como resultados do estudo, conforme normas regulamentares

estabelecidas em 3 de abril de 2008 pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

O primeiro artigo original intitula-se “*Vitamin A deficiency and associated factors in the mother-newborn pairs*” e descreve as concentrações de retinol avaliadas nos fluidos biológicos: sangue materno, soro de cordão umbilical e leite materno, associando-as às características sociodemográficas e obstétricas. O referido artigo foi submetido para publicação no *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (Anexo A).

O segundo artigo, cujo título é “*Effect of maternal supplementation of vitamin A given at different intervals on breast milk levels of retinol*”, avalia a interferência de quatro diferentes regimes de suplementação materna nas concentrações de retinol no leite materno após 12 semanas após o parto. Este artigo foi submetido à publicação no *Nutrition Research* (Anexo B).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NOMENCLATURA E FONTES DIETÉTICAS DA VITAMINA A

“Vitamina A” (VA) é o descritor genérico para todo composto que possui atividade biológica de retinol; enquanto o termo “retinóides” inclui formas naturais de VA e os muitos análogos sintéticos do retinol com ou sem atividade biológica (COMBS Jr, 2012). Ambos são compostos apolares sensíveis à degradação oxidativa ou isomerização quando expostos à luz, oxigênio, metais reativos e calor (SOLOMONS, 2012).

Naturalmente, a VA pré-formada (retinol) ocorre na forma de ésteres de retinil de cadeia longa, tendo como suas formas metabolicamente ativas, os seus correspondentes aldeído (retinal) e ácido (ácido retinóico). Já os carotenóides com atividade pró-vitamina A, isto é, aqueles que podem ser clivados por animais para produzir pelo menos uma molécula de retinal, incluem principalmente o β -caroteno e, em menores proporções, o α -caroteno e as β -criptoxantinas (McLAREN, KRAEMER, 2012; ROSS, 2013).

Os retinóides pré-formados são armazenados nos tecidos animais e estão presentes, especialmente no fígado, nas vísceras, na gema de ovo, na carne e no leite, predominantemente na forma de retinil-palmitato (ALMEIDA-MURADIAN; PENTEADO, 2003; BLOMHOFF, 2006; SOLOMONS, 2012). Em contrapartida, os carotenóides pró-vitamina A, são sintetizados como pigmentos por muitas plantas e encontrados em tecidos vegetais amarelos, alaranjados e verde-escuros como mangas, mamão, abóbora, cenoura e espinafre, tornando-se mais acessíveis que os produtos de origem animal e, principalmente por isso, contribuem com a maior parte da VA nas dietas das populações economicamente desfavorecidas (FRASER, BRAMLEY, 2004; FAO/WHO, 2001).

2.2 ABSORÇÃO, TRANSPORTE E ASPECTOS METABÓLICOS DA VITAMINA A

A VA ao chegar no trato gastrointestinal, sofre absorção de modo semelhante às gorduras. Ésteres de retinil e carotenóides juntamente com outros componentes dietéticos insolúveis em água são parcialmente libertados do alimento por proteólise e emulsionados no estômago antes da entrada no intestino delgado (LEVIN, 2004).

Dentro do lúmen intestinal, ésteres de retinil são hidrolisados a ácidos graxos livres e retinol livre tanto por enzimas secretadas pelo pâncreas (lipase pancreática) como por outras esterases (retinil éster hidrolase), sendo em seguida bem absorvidos (70% - 90%) pelas células da mucosa intestinal, os chamados enterócitos. Os carotenóides, por sua vez, tanto podem ser absorvidos intactos ou clivados nos enterócitos através da enzima caroteno dioxigenase para gerar o retinaldeído, sendo posteriormente reduzido a retinol pela retinol dehidrogenase. Todavia, a absorção dos carotenóides é particularmente dependente da composição da dieta e varia de 5 a 50%, podendo ser aumentada por dietas ricas em gordura (McLAREN, FRIGG, 2001; LEVIN, 2004).

No enterócito, o retinol livre é ligado à uma proteína específica de ligação ao retinol celular tipo II (CRBP II – *celular retinol binding protein II*) que evita sua oxidação e o direciona à reesterificação com ácidos graxos de cadeia longa realizada pelas enzimas lecitina-retinol aciltransferase (LRAT) e acil coenzima A retinol aciltransferase (ARAT) (COMBS Jr, 2012).

Juntamente com lípidos exógenos, ésteres de retinil recém-formados e carotenóides não hidrolisados são incorporados em quilomicrons e seus remanescentes e transportados do intestino para o fígado, onde são armazenados nas células de Ito/estreladas, todavia, uma parte da VA também pode ser armazenada no tecido adiposo ou em outros tecidos como, por exemplo, na glândula mamária durante a lactação (IOM, 2006; ROSS, 2013). Quanto aos carotenóides não hidrolisados, uma parte é clivada por uma caroteno dioxigenase hepática, novamente dando origem a retinaldeído e ésteres de retinil; e o restante é segregado em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs), que levam os carotenóides a outros tecidos onde a clivagem pode ser feita por caroteno dioxigenases locais (BENDER, 2009).

Quando a ingestão de VA é adequada, mais de 90% do total desta vitamina do corpo está localizada no fígado, que continuamente libera o retinol livre para a circulação em um

processo que depende da disponibilidade de proteína de ligação ao retinol (*Retinol Binding Protein* - RBP) (IOM, 2006).

O retinol ligado à RBP deixa o fígado e entra no sangue, onde se associa à transtirretina (TTR), formando o complexo retinol:RBP:TTR. Esse complexo transporta o retinol até os tecidos-alvos periféricos, onde receptores de superfície celular capturam o retinol do complexo retinol:RBP:TTR, transferindo-o para uma RBP intracelular (BENDER, 2009). Já nos tecidos, além de ser esterificado para o armazenamento, o retinol também pode ser oxidado uma vez para gerar retinal, e duas vezes para gerar o ácido retinóico (AR), podendo assim, agir por diferentes mecanismos e apresentar funções específicas de acordo com o tecido, órgão ou sistema orgânico (MAHAN, ESCOTT-STUMP, 2005; BIESALSKI, 2007).

2.3 FUNÇÕES DA VITAMINA A

Após um processo de oxidação reversível, o retinol é convertido à forma retinaldeído (11-*cis*-retinal), envolvendo-se no processo visual, onde é componente estrutural dos pigmentos visuais dos cones e bastonetes da retina sendo, assim, essencial para a foto-recepção (COMBS Jr, 2012).

Além da função visual, em vista do fato de que os receptores nucleares para os retinóides têm sido identificados em praticamente todo o tipo de célula, pode-se argumentar que de alguma forma a VA desempenha um papel em todos os processos corporais (McLAREN, KRAEMER, 2012).

Nesse sentido, o AR juntamente com seus isômeros medeia quase todas as funções sistêmicas dependentes de VA. Tal como os hormônios esteróides e vitamina D, o AR, interage com receptores nucleares e regulam a transcrição de genes específicos, relacionados ao desenvolvimento de tecidos, vértebras, aparelhos visual, circulatório, auditivos, além de codificadores de enzimas, receptores, proteínas da matriz celular, entre outros. Além disso, o AR é ainda responsável por manter a proliferação e diferenciação celular, reprodução e resposta imune (IOM, 2001; BLOMHOFF, BLOMHOFF, 2006; BENDER, 2009).

Contudo, cabe destacar que mesmo as variações de VA dentro de um aparente intervalo considerado adequado, podem influenciar a saúde humana e modular a função fisiológica desse micronutriente (SOLOMONS, 2012). Assim, para que a VA possa desempenhar suas diversas funções satisfatoriamente, de modo a manter o estado nutricional do indivíduo e suas funções orgânicas em equilíbrio, faz-se necessário que sejam atendidos os requerimentos nutricionais individuais para esse micronutriente.

2.4 REQUERIMENTOS DE INGESTÃO DE VITAMINA A

Requerimento nutricional é um nível de consumo que irá atender a critérios específicos de adequação, evitando risco de déficit ou excesso de um determinado nutriente. Estes critérios incluem um gradiente de efeitos biológicos relacionados com o consumo de nutrientes, cuja importância se dá através da prevenção da morte, doença clínica ou condições patológicas sub-clínicas, identificadas por meio de ensaios bioquímicos ou funcionais (FAO/WHO, 2001).

O requerimento da VA é baseado na quantidade absorvida, necessária para manter o estado nutricional do indivíduo adequado. Já as recomendações de ingestão de VA compreendem as quantidades a serem ingeridas diariamente para satisfazer seus níveis de requerimento. Esses diferem de acordo com o sexo, idade e situações fisiológicas especiais que aceleram o uso, estocagem ou destruição da vitamina, tais como a gestação, lactação e doenças crônicas e agudas (SOLOMONS, 2001). Nesse sentido, quando as recomendações de ingestão individuais são consideradas, para um nível de consumo de referência garantir mais de 90% de probabilidade de satisfazer o requerimento de VA para um indivíduo saudável, as *Dietary Reference Intakes* (DRIs), criadas pelo *Institute of Medicine* (IOM), calculam a *Recommended Dietary Allowance* (RDA) (IOM, 2001), as quais são apresentadas por estágio de vida no quadro 1 a seguir.

Quadro 1- Recomendações para ingestão diária de vitamina A nos diferentes estágios de vida

Estágio de Vida	DRI_s - RDA/AI* (µg/dia)	DRI_s - RDA/AI* (UI)
Crianças		
0 - 6 meses	400*	1.333*
7 - 12 meses	500*	1.667*
Gestantes		
≤ 18 anos	750	2.500
19 – 50 anos	770	2.567
Nutrizes		
≤ 18 anos	1.200	4.000
19 – 50 anos	1.300	4.333

RDA = *recommended dietary allowance*. AI = *adequate intake*. UI = unidades internacionais.

Fonte: Adaptado de IOM (2001).

As recomendações de VA são importantes para o adequado planejamento e avaliação da ingestão, todavia, deve-se considerar e contabilizar a biodisponibilidade proporcional da vitamina pré-formada (cerca de 90%) e carotenóides pró-vitamina de uma dieta que contenha gordura suficiente (pelo menos 5-10 g) para uma adequada absorção (FAO/WHO, 2001).

Nesse contexto, cabe destacar que os carotenóides são convertidos em VA com diferentes graus de eficiência, sendo a maior atividade biológica apresentada pelo β -caroteno. Assim, uma vez que existem muitas formas e eficiências de utilização diferenciadas para a VA, torna-se necessário expressar a sua bioatividade total em termos de equivalentes. Por isso, na atualidade, os requerimentos para a VA são indicados em equivalentes de retinol (RAEs - *Retinol Activity Equivalents*), de modo que 1 µg de RAE corresponde a 1 µg de retinol-*all-trans*, 2 µg de β -caroteno em óleo, 12 µg de β -caroteno em mistura de alimentos, e 24 µg α -caroteno ou β -criptoxantina (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002; IOM, 2006).

Contudo, ainda uma série de outros fatores como a desnutrição energético-protéica, deficiência de zinco, gorduras, álcool, infecções e grau de processamento da matriz de alimentos afetam a biodisponibilidade e bioconversão de retinol e carotenóides (BLOMHOFF, BLOMHOFF, 2006). Portanto, pode-se dizer que as contribuições dietéticas relativas de VA são

influenciadas pela disponibilidade de alimentos e hábitos alimentares pessoais, o que pode ser significativamente diferente entre populações.

Em dietas de onívoros americanos, as necessidades de VA são satisfeitas com produtos de origem animal e alimentos fortificados; no entanto, nas dietas de vegetarianos e de muitas famílias pobres nos países em desenvolvimento, as únicas verdadeiras fontes de VA são alimentos de origem vegetal - especialmente as verduras (COMBS Jr, 2012), ficando evidente a importante contribuição dos carotenóides para o atendimento às necessidades nutricionais da vitamina, principalmente em populações carentes (PENTEADO, 2003).

Em se tratando de alta ingestão, o elevado consumo de β -caroteno ou outros carotenóides não tem sido frequentemente relacionado a casos de toxicidade. As inofensivas colorações da pele na forma de carotenodermia (coloração amarela) ou lycopenodermia (coloração laranja) são consideradas os únicos efeitos adversos comprovados associados ao excesso de consumo de carotenóides através de alimentos e suplementos, sendo essas alterações de coloração revertidas quando a ingestão de caroteno é interrompida (IOM, 2006; ROSS, 2013).

Ao contrário do que é relatado para o alto consumo de β -caroteno, a ingestão elevada de pré-vitamina A pode resultar em hipervitaminose A aguda ou crônica. No primeiro caso, os sintomas sugerem aumento da pressão intracraniana como, por exemplo, náuseas, vômitos, dor de cabeça e abaulamento fontanela (lactentes e crianças jovens). Já na forma crônica de toxicidade por VA, a sintomatologia pode ser muito variada, afetando sistemas orgânicos diferentes e, por vezes, imitando outras doenças. Entre os sintomas mais comuns estão, diplopia, alopecia, secura das mucosas, descamação, dores ósseas e articulares, lesões no fígado e coma, podendo ainda aumentar o risco de defeitos físicos congênitos, caso a alta ingestão aconteça durante o período gestacional (IOM, 2001; McLAREN, KRAEMER, 2012).

Neste contexto, o estabelecimento do UL (*Tolerable Upper Intake Level*), se faz relevante devido ao aumento da disponibilidade de alimentos fortificados e uso de suplementos dietéticos, não sendo, portanto, o nível de ingestão recomendado e sim, o nível máximo tolerado de ingestão diária que não causa efeitos adversos para a saúde de quase todos os indivíduos em uma população saudável. Todavia, o UL de VA não se aplica a populações de indivíduos que estejam recebendo suplementação de VA ou ingerindo periodicamente alimentos fortificados de maneira a prevenir ou tratar a deficiência de vitamina A (DVA), uma carência nutricional associada a várias manifestações clínicas e funcionais (IOM, 2006).

2.5 DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A

2.5.1 Fatores etiológicos

A influência da VA é particularmente crítica durante períodos de grande proliferação e diferenciação celular como a primeira infância e a gestação (AZAÏS-BRAESCO; PASCAL, 2000), por isso, crianças jovens e mulheres em idade reprodutiva compõem os grupos de maior vulnerabilidade para a DVA (WHO, 2001; WEST Jr et al., 2002).

De modo amplo, a DVA pode ocorrer por dois motivos principais: insuficiente ingestão dietética de pró-vitamina A e/ou pré-vitamina A (causa primária) de modo crônico, ou por causa de falhas na sua utilização fisiológica, como por exemplo, absorção dietética insuficiente de zinco, proteínas, gorduras e/ou óleos (causa secundária) (COMBS Jr, 2012).

Contudo, quando a atenção é direcionada às causas da DVA na população de neonatos, a situação torna-se ainda mais complexa, comparativamente à população geral. Isso acontece porque a progressão e manutenção normal do status de VA durante a fase inicial da vida é influenciada por seus estoques hepáticos de retinol ao nascimento, pelo consumo da VA através do leite materno e de outros alimentos e por perdas devido às infecções e parasitas, uma vez que a DVA ocorre frequentemente como parte de um "ciclo vicioso", em que a infecção se agrava e aumenta a susceptibilidade à deficiência nutricional (ALLEN, HASKELL, 2001; MILLER et al., 2002).

Nesse cenário, a preocupação com os bebês se intensifica, uma vez que, ao nascer, eles possuem habitualmente níveis baixos de VA no plasma e tecidos, e os primeiros meses de vida são considerados críticos para a criação de estoques de VA em um nível que seja suficiente para a prevenção da DVA após o período de desmame (UNDERWOOD, 1994). Consequentemente, os bebês dependem do leite materno e a transferência de VA realizada pela mãe durante a lactação torna-se, então, quantitativamente fundamental até que a alimentação complementar seja adequadamente instituída (STOLTZFUS, UNDERWOOD, 1995).

Desse modo, quando oferecido de forma pertinente (exclusivo durante os seis meses iniciais após o nascimento e complementado até os dois anos de idade), o leite materno é

considerado o grande fator protetor contra a DVA para lactentes (MARTINS, 2007). Contudo, se os recém-nascidos não ingerem o colostro, ou nos casos onde a amamentação é inadequada, a DVA pode ainda se apresentar mesmo em crianças em aleitamento materno, uma vez que em populações em risco de DVA, quanto menor a duração do aleitamento materno, mais cedo ocorre o início da deficiência (STOLTZFUS, UNDERWOOD, 1995; HASKELL, BROWN, 1999; BRASIL, 2004). Além disso, o inadequado status de VA da mãe pode afetar negativamente as concentrações de VA no seu leite e, conseqüentemente, o status do seu bebê. Assim, mesmo em aleitamento materno exclusivo, crianças menores de dois anos estão suscetíveis à DVA quando suas mães produzem leite materno com baixas concentrações de VA, em consequência da sua própria deficiência nutricional (MILLER et al., 2002).

Somando-se aos fatores supracitados, outras circunstâncias podem ainda contribuir para a maior suscetibilidade de algumas populações às desordens causadas pela DVA. O diagrama de fluxo abaixo (Figura 1) mostra combinações de fatores de risco que conspiram juntos em diferentes estágios do ciclo de vida para predispor uma comunidade ao desenvolvimento e persistência dos transtornos provocados pela DVA (McLAREN, KRAEMER, 2012).

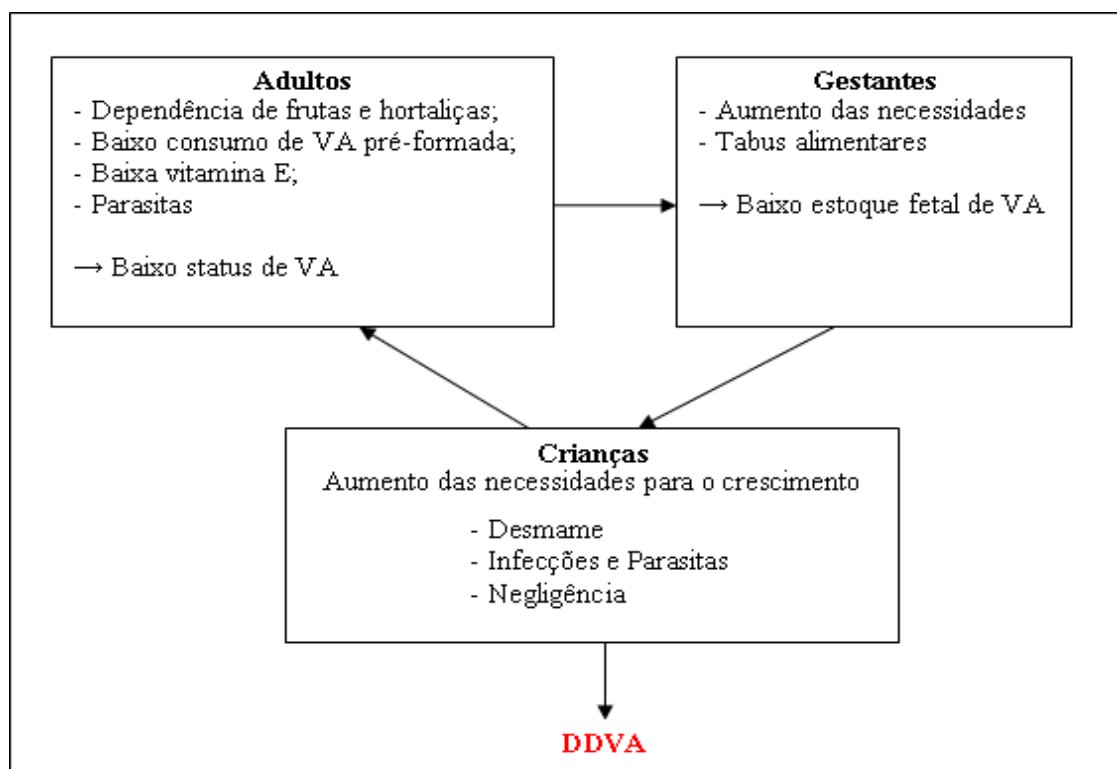


Figura 1. Ciclo dos fatores causais das doenças por deficiência de vitamina A (DDVA)

Fonte: Adaptado de McLaren, Kraemer (2012).

2.5.2 Epidemiologia e impacto na saúde

Estima-se que mundialmente, entre o período de 1995-2005 a DVA afetou 1/3 (190 milhões) das crianças em idade pré-escolar e aproximadamente 15% (19,1 milhões) das mulheres grávidas, estando a maioria na África e Sudoeste da Ásia (WHO, 2009a).

Nesta perspectiva, apesar de grandes avanços no conhecimento da biologia da VA, a sua deficiência ainda constitui um dos principais problemas nutricionais de populações de países em desenvolvimento, como o Brasil, onde a DVA é considerada um problema de saúde pública moderado (WHO, 2009a), e se estende a todas as regiões brasileiras. Deste modo, 17,4% das crianças e 12,3% das mulheres em idade fértil apresentam concentrações séricas inadequadas de VA, segundo a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher (PNDS-2006) (BRASIL, 2009). A grande relevância desses dados se mostra no impacto que a DVA pode provocar na saúde desses indivíduos.

Uma vez que a VA desempenha funções em muitos órgãos do corpo, a inadequação do status desta vitamina pode levar a uma sequência de eventos fisiológicos que, finalmente, se manifestam em vários sinais clínicos, como cegueira noturna, xerose da conjuntiva, mancha de bitot, xerose corneal, ceratomalácia, cicatriz corneal e *fundus xeroftalmicus*, conhecidos em conjunto como “xeroftalmia”. Como agravante, se tem o fato de que as manifestações da xeroftalmia são evolutivas e podem culminar em cegueira nutricional irreversível (McLAREN, KRAEMER, 2012).

De modo geral, as consequências para a saúde pública que podem ser atribuídas à DVA, ou seja, as “doenças por deficiência de vitamina A” (DDVAs), incluem as manifestações específicas oculares da xeroftalmia e sua seqüela, a cegueira, bem como as consequências inespecíficas como anemia, disfunção imunológica, aumento da susceptibilidade para infecção, crescimento insuficiente e mortalidade (SOMMER, DAVIDSON, 2002; WEST JR, 2002). Contudo, dada à falta de especificidade desses agravos, de fato, as desordens oculares são os únicos sinais/indicadores inequívocos de DVA (COMBS Jr, 2012).

2.5.3 Indicadores diagnósticos

A melhor estimativa de estoques de VA é a avaliação das reservas hepáticas através da biópsia do fígado; entretanto, por ser muito invasivo, este método não é adequado para a avaliação de rotina do estado da VA de populações. Nesse contexto, surgem os biomarcadores de VA que, de modo amplo, podem ser agrupados em duas categorias principais: (1) Os indicadores biológicos: clínico (xeroftalmia), funcional (cegueira noturna) e histológicos (citologia de impressão conjuntival); e (2) indicadores bioquímicos qualitativos (retinol sérico e concentração de retinol no leite materno) e quantitativos [RBP, teste de resposta relativa à dose-(RDR), teste de resposta relativa à dose modificado (MRDR), teste de resposta sérica de 30 dias (+S30DR)]. Os sinais clínicos são específicos e de fácil detecção para a avaliação da DVA, todavia, estes são inadequados quanto ao estado de deficiência nutricional sub-clínica, considerado de difícil diagnóstico (WHO, 1996; TANUMIHARDJO, 2012).

Atualmente há disponível uma variedade de métodos de avaliação de níveis subclínicos de VA, o que faz com que a decisão sobre a escolha do método seja muito difícil. Cada método é útil na identificação de diferentes populações e apresenta vantagens e limitações (WHO, 1996; McLAREM, FRIGG, 1999).

Contrariamente ao indicador clínico da xeroftalmia, a avaliação funcional é um indicador subclínico e, desse modo, faz o diagnóstico anterior ao surgimento das manifestações clínicas oculares; no entanto, necessita treinamento e habilidade para a utilização. Já os indicadores histológicos, são de fácil técnica, mas subjetivos e não têm padronização na interpretação. Por fim, os indicadores bioquímicos detectam precocemente casos de carência subclínica, mas, em sua maioria, são considerados invasivos e de elevado custo (WHO, 1996; NETO, PRIORE, FRANCESCHINI, 2006).

Assim, a escolha depende do objetivo de seu uso, devendo-se considerar o custo, o tempo, os equipamentos e o treinamento necessários para a sua realização (NETO, PRIORE, FRANCESCHINI, 2006). Isso se faz ainda mais relevante, visto que além de identificar mais especificamente as populações em risco de DVA, os biomarcadores de VA também são necessários para avaliar e monitorar a eficácia de diferentes intervenções de controle a essa deficiência (TANUMIHARDJO, 2012).

2.5.4 Estratégias de intervenção

Em consonância aos principais fatores geradores de risco para a DVA em populações, especialmente àquelas socioeconomicamente desfavorecidas, para evitar ou reduzir esta carência nutricional, as principais intervenções comunitárias são resumidamente agrupadas em três esferas: (1) educação alimentar e nutricional e incentivo à produção e consumo de alimentos fontes de VA, além de políticas econômicas/alimentares; (2) fortificação de um alimento básico ou condimento com a VA, por exemplo, enriquecimento da farinha de milho, óleos comestíveis e arroz; e (3) distribuição programada de suplementos de VA em altas doses aos grupos de risco (WHO, 2009a; McLAREN, FRIGG, 1999).

Sabe-se que intervenções alimentares que promovam a geração e consumo de alimentos ricos em micronutrientes, têm várias vantagens sobre outros tipos de programas, pois essas, muitas vezes melhoram a qualidade da alimentação e empoderam as mulheres. Ademais, além de aumentar o nutriente-alvo, essas ações ainda contribuem para a segurança alimentar e renda familiar (REDDY, 2003).

Nesta perspectiva, o incentivo ao consumo e cultivo de alimentos ricos em VA, bem como alimentos enriquecidos com esse micronutriente, apresenta caráter mais sustentável para melhorar a situação das comunidades em risco de DVA, em comparação às doses suplementares periódicas ou ocasionais; todavia, respostas efetivas a essas estratégias são esperadas apenas em médio e longo prazo (TANUMIHARDJO, 2004).

Apesar do elevado dispêndio financeiro, de acordo com o Dr. Dean Jamison, do *National Institutes of Health*, na Bethesda, Maryland (USA), na comparação entre os benefícios e os custos oriundos de uma ampla gama de intervenções públicas, a suplementação em altas doses de VA e a fortificação de alimentos, mantêm-se entre os investimentos mais atraentes quando se avalia a relação custo-efetividade das intervenções, visto que ambos os tipos de programas são altamente rentáveis em termos de vidas salvas e redução de anos de vida alterados por incapacidade (JAMISON, 2003).

Todavia, para que tenham sucesso, os programas de fortificação de alimentos muitas vezes têm de fazer face às barreiras políticas, comerciais e regulamentares (IVACG, 2002). Desse modo, em curto prazo, torna-se importante a incorporação de programas de suplementação

de VA em programas de saúde de países em desenvolvimento, principalmente em populações onde o consumo dietético de VA pelos grupos de risco seja insuficiente, encontrando-se, assim, em risco de DVA (PAHO, 2001; TANUMIHARDJO, 2004). Nesse contexto, a suplementação combinada de mulheres logo após o parto e de seus filhos pequenos podem ajudar a melhorar o status de VA materno-infantil.

2.5.4.1 Suplementação materno-infantil no Mundo

De acordo com a OMS (2013b), nos países onde a DVA é um problema de saúde pública, os programas que fornecem suplementos de VA em megadoses para crianças de 6-59 meses de vida tem sido implementados como estratégia para melhorar a sobrevivência infantil. Em muitos casos, a suplementação é fornecida quando as crianças entram em contato com o sistema de saúde, aproveitando-se dos momentos imediatamente após o nascimento, e/ou em visitas pós-natais ou de imunização.

Evidências apontam que em contextos comunitários nos países em desenvolvimento, a suplementação preventiva atua na redução global da mortalidade, bem como na redução de mortes por causa específica de diarreia em crianças na faixa etária supracitada (OMS, 2013b; IMDAD et al., 2011).

Como os recém-nascidos não estão incluídos nesta programação de suplementação com megadoses de VA, tem-se verificado grande interesse na suplementação de VA no período neonatal (primeiros 28 dias de vida) como uma estratégia para também melhorar a sobrevivência de bebês de 0-6 meses de vida (KIRKWOOD, HUMPHREY, MOULTON, MARTINES, 2010). Entretanto, as evidências disponíveis para os resultados esperados foram consideradas conflitantes em duas revisões sistemáticas (HAIDER, BHUTTA, 2011; GOGIA, SACHDEV, 2011) usadas para o desenvolvimento de orientações sobre a suplementação de VA em neonatos e por isso, atualmente, a OMS não recomenda a suplementação neonatal de VA como intervenção de saúde pública para reduzir a morbidade e mortalidade infantil (OMS, 2013c), complementando que se deve continuar a encorajar as mães a alimentar seus bebês

exclusivamente com leite materno durante os primeiros 6 meses de vida, para que atinjam o crescimento, desenvolvimento e saúde ideais.

Nesse contexto, a suplementação da nutriz com alta dose [200.000 UI (60mg)] de VA após o parto (até 6 semanas) seria uma estratégia mais segura para incrementar o estado nutricional de bebês menores de 6 meses de idade, além de ao mesmo tempo também beneficiar a lactante (WHO/UNICEF/IVACG, 1997). Todavia, para o alcance dos benefícios esperados, essa estratégia depende do aumento nos níveis de VA do leite materno e da frequência e duração adequadas da amamentação (CHRISTIAN, 2010).

Nessa perspectiva, a suplementação materna com 200.000 UI de VA no pós-parto imediato foi considerada insuficiente para assegurar a permanência de adequadas concentrações desse micronutriente no leite materno ao longo do tempo, bem como corrigir a DVA subclínica em mulheres e seus bebês (HUMPHREY, ICHORD, 2001; RICE et al., 1999; BAHL et al., 2002; SOMMER, DAVIDSON, 2002), deixando assim de ser recomendada pela OMS em sua nova diretriz (OMS, 2013a).

Através de cálculos teóricos e modelagem cinética, foi mostrado que pelo menos duas doses de 200.000 UI de VA seriam necessárias para manter concentrações adequadas de retinol no leite materno e que este regime de dosagem seria seguro (BENOIST, MARTINES GOODMAN, 2001; ALLEN, HASKELL, 2002). Diante disso, o Grupo Consultivo Internacional da vitamina A (*International Vitamin A Consultative Group* - IVACG) fez a recomendação provisória para se administrar duas doses de 200.000 UI [400.000 UI (120mg) no total] de VA, para mulheres no pós-parto que vivem em áreas endêmicas de DVA, respeitando-se o intervalo mínimo de 24 horas entre cada dose, sendo a segunda dose ofertada em até 6 semanas pós-parto (período infértil), uma vez que altas doses de suplementos de VA podem causar efeitos teratogênicos no início da gravidez (IVACG, 2002).

O espaçamento mínimo de 24 horas entre as duas doses minimizaria o risco de aumentar as concentrações de ácido retinóico do leite materno a níveis hipoteticamente tóxicos (ROSS, 2002), uma vez que 24 horas pode ser considerado tempo suficiente para que a primeira dose seja metabolizada e absorvida pelo fígado. Entretanto, um intervalo maior teoricamente asseguraria uma melhor retenção da segunda dose de VA (BENOIST, MARTINES GOODMAN, 2001). Em todo modo, isso deveria ser feito o mais cedo possível após o parto,

para maximizar os benefícios da VA no status materno, nas concentrações no leite materno e no estado nutricional do lactente (SOMMER, DAVIDSON, 2002).

Alguns estudos avaliando a suplementação com 400.000 UI de VA no pós-parto e seus efeitos nas concentrações de retinol no soro e leite materno e/ou na saúde materno-infantil foram realizados, inclusive no Brasil, mas ainda não foram observados resultados estatisticamente animadores (TCHUM et al., 2006; IDINDILI et al., 2007; DARBOE et al., 2007; BEZERRA et al., 2010; FERNANDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013). Contudo, não existem estudos que tenham avaliado a suplementação materna via oral com 400.000 UI dividida em duas doses (200.000 + 200.000 UI) e administrada em diferentes momentos, para que fosse observado se o intervalo de tempo entre a primeira e a segunda administração (24h a 6 semanas) poderia influenciar os resultados. Assim, permanece uma lacuna cujo presente estudo propõe investigar.

2.5.4.2 Suplementação materno-infantil no Brasil

Há décadas, a necessidade de intervenções eficazes para reduzir a prevalência elevada da carência de V A no Brasil vem sendo demonstrada (MARTINS, 2007).

Nessa perspectiva, desde 2005, o Ministério da Saúde do Brasil, desenvolve o “Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A”, em áreas brasileiras consideradas de risco para a DVA. Até o primeiro semestre de 2012, o Programa abrangia a Região Nordeste; municípios do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, localizados no Estado de Minas Gerais; Região Norte; Estado de Mato Grosso e alguns Distritos Sanitários Especiais Indígenas. A partir do segundo semestre de 2012, o Programa foi ampliado para todo o país (todos os municípios da Região Norte e Distritos Sanitários Especiais Indígenas e municípios prioritários do “Plano Brasil Sem Miséria” das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul) (BRASIL, 2013).

Apesar da OMS (2013a) não mais recomendar a suplementação materna com megadose de VA no puerpério como intervenção de saúde pública para prevenção da morbidade e mortalidade materna e infantil, o Brasil, assim como outros países em desenvolvimento, incentiva o uso de suplemento com megadose de VA para as mulheres no pós-parto imediato, considerando que apenas o consumo dietético diário de VA por mulheres no puerpério não é

suficiente para prevenir a deficiência nutricional deste nutriente e suas consequências (BRASIL, 2013).

Nesse contexto, a Portaria nº 729, de 13 de maio de 2005 regulamenta até a atualidade que a suplementação profilática com megadoses de VA deve ser administrada de forma periódica e regular às crianças de 6 a 59 meses de idade, e administrada às mulheres no pós-parto imediato (BRASIL, 2005). Nesse último caso, a suplementação acontece somente na Região Nordeste e em alguns municípios situados na Região Norte, Estado de Minas Gerais e Mato Grosso (BRASIL, 2013).

O calendário e o esquema de administração das suplementações no Brasil são apresentados a seguir:

Quadro 2 – Esquema para administração de vitamina A em crianças e puérperas.

Idade	Dose	Frequência
Crianças: 6 – 11 meses	100.000 UI (30 mg)	Uma dose
Crianças: 12 – 59 meses	200.000 UI (60 mg)	Uma dose a cada 6 meses
Puérperas	200.000 UI (60 mg)	Uma dose no pós-parto imediato (antes da alta hospitalar)

Fonte: Adaptado de BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 729, de 13 de maio de 2005.

Outras importantes ações de prevenção da DVA, também adotadas pelo Ministério da Saúde brasileiro (BRASIL, 2005), são a promoção ao aleitamento materno exclusivo até 6 meses e complementar até 2 anos de idade ou mais, com a introdução dos alimentos complementares em tempo oportuno e de qualidade; além do fortalecimento das atividades educativas de orientação alimentar e nutricional, assegurando informações de incentivo ao consumo de alimentos fontes em VA, estando de acordo com as principais estratégias mundiais de combate e controle da DVA.

No entanto, para que sejam presumidos e esclarecidos todos os potenciais efeitos das ações estratégicas de combate e controle à DVA, especialmente quanto à suplementação materna, e assim possam ser confirmadas as ações mais acertadas quanto ao incremento do estado nutricional de VA nos pares de mãe-filho em curto prazo, a OMS (2013a) aponta a necessidade de realização de pesquisas sobre os efeitos dos suplementos de VA, com relação às

concentrações de retinol no leite materno quando a megadose única (200.000 UI) for administrada às lactantes, semanas após o parto, em contraste à suplementação no pós-parto imediato, como ainda adotada no Brasil e em outros países em desenvolvimento.

Ademais, dadas as lacunas existentes na literatura, uma vez que existem diferenças entre os regimes de suplementação seguidos por diversas populações, também ainda se faz necessária a realização de estudos que comparem a dose única com a dose dupla de 200.000 UI de VA, bem como avaliem o momento ideal para a suplementação, de modo a identificar se estas variações quanto à posologia e/ou tempo podem impactar significativamente nos níveis de retinol no leite materno e assim fundamentar a recomendação de ações estratégicas direcionadas a cada contexto populacional.

Em consonância a estas necessidades, o presente estudo ao construir o seu desenho investigativo, teve o propósito de ajudar a melhorar a saúde materno-infantil, uma vez que também, e principalmente, servirá de base para o conhecimento da realidade quanto ao estado nutricional em VA do binômio mãe-filho da população de Santa Cruz-RN, fornecendo subsídios para o melhor planejamento de ações públicas voltadas para o combate da DVA na população-alvo, visto que dados quanto a esta carência ainda não foram levantados naquela região.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação oral materna com megadose de vitamina A, administrada em diferentes posologias (200.000 UI ou 200.000 + 200.000 UI) e em diferentes momentos do pós-parto (0h, 24h, 1 semana ou 4 semanas), na concentração de retinol no leite materno.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as características sociodemográficas e obstétricas da população;
- Identificar a concentração de retinol do cordão umbilical dos recém-nascidos;
- Identificar a concentração de retinol sérico materno no *baseline*;
- Identificar as concentrações de retinol no leite materno no *baseline*, 24h, 1, 4 e 12 semanas pós-parto;
- Verificar a associação entre as concentrações de retinol do soro materno, do cordão umbilical e do colostro;
- Verificar associação entre o estado nutricional de VA materno e o estado nutricional de VA dos recém-nascidos;
- Verificar a relação das concentrações de retinol de cada tipo de amostra biológica (colostro, soro materno e soro de cordão umbilical) com variáveis sócio-demográficas e obstétricas;
- Avaliar, intra e inter-grupos, as concentrações de retinol no leite materno durante as primeiras 12 semanas pós-parto;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO, POPULAÇÃO E LOCAL DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de intervenção clínica, desenvolvido com pares mãe-filho, assistidos no hospital amigo da criança: Hospital Universitário Ana Bezerra (HUAB) - UFRN, localizado no município de Santa Cruz-Rio Grande do Norte, com acompanhamento durante as primeiras 12 semanas pós-parto.

4.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Fizeram parte da pesquisa, mulheres voluntárias entre 18-40 anos de idade, de baixo risco obstétrico, juntamente com seus respectivos recém-nascidos.

Uma vez que algumas situações poderiam interferir na avaliação dos resultados, não foram incluídas no estudo, portadoras de diabetes, hipertensão, neoplasias, doenças do trato gastrointestinal e hepáticas, cardiopatias, doenças infecciosas, transtorno mental e que tiveram parto pré-termo (IG abaixo de 37 semanas), mulheres com conceitos múltiplos e/ou com malformações e que fizeram uso de suplementos vitamínicos contendo VA, durante a gestação. Quanto às crianças, foram excluídas aquelas com prematuridade, paralisia cerebral, malformações do aparelho digestivo, malformações cardiovasculares e pulmonares, e malformações da cavidade oral dificultadoras da sucção ao peito.

4.3 TAMANHO DA AMOSTRA

O cálculo do tamanho amostral foi realizado através de método inferencial, sendo utilizados valores médios e medida de dispersão de concentrações de retinol no leite materno,

tomando-se como base que o desvio padrão do retinol no leite materno não seria maior que $0,43\mu\text{mol/L}$ (média = $3,9\mu\text{mol/L}$) (DIMENSTEIN et al., 2010). Consequentemente, seria necessário recrutar 14 mulheres em cada grupo para detectar uma diferença de $0,3\mu\text{mol/L}$ com poder de 80% e confiança de 95%.

4.4 CAPTURA DOS PARTICÍPIES E COLETA DE DADOS

A coleta dos dados da pesquisa foi realizada no período de julho/2011 a julho/2014. Foram utilizados dois formulários padronizados para coleta de informações socioeconômicas e demográficas, dados do pré-natal e parto (APÊNDICES A e B). Todos os integrantes auxiliares do experimento foram treinados e orientados sobre os procedimentos e a rotina de desenvolvimento da pesquisa, para que fossem normatizados o preenchimento ou transcrição dos dados para o questionário, bem como para maior confiabilidade às intervenções necessárias ao estudo.

Para a classificação do estado nutricional antropométrico, o peso e a estatura maternos referentes à última consulta do pré-natal foram coletados do cartão de acompanhamento e empregados no cálculo do índice de massa corporal (IMC) para a idade gestacional, proposto por Atalah et al. (1997) e adotado pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2011). O peso e o comprimento do bebê ao nascimento foram coletados do prontuário hospitalar. O índice *peso para idade* (P/I) foi expresso em escore-z e analisado no software Anthro versão 3.0 (WHO, 2009b), para identificar o estado nutricional antropométrico dos recém-nascidos. A eutrofia foi definida a partir do ponto de corte do escore-z $+1,00$ e $-1,00$, e a desnutrição, pelo escore-z para P/I abaixo de $-2,00$. Possível risco para sobrepeso definiu-se a partir do P/I entre $+1,00$ e $+1,99$, e sobrepeso entre $+2,00$ e $+2,99$; para a obesidade, foi utilizado o P/I acima de $+3,00$ (WHO, 2009b).

Casos de anemia materna durante a gestação foram identificados a partir dos resultados de hemoglobina ($<11\text{ g/dL}$) e hematócrito ($<33\%$) (WHO, 2001).

Além dos dados supracitados, também foram coletadas amostras de leite materno e de sangues venoso materno e do cordão umbilical, como descrito a seguir.

4.5 MODELO DE INTERVENÇÃO

- Momento 1: *INTERNAÇÃO PARA O PARTO* (Figura 2).

Seguindo a rotina do hospital, no internamento para o parto, os técnicos do laboratório do HUAB-UFRN, coletaram, por punção venosa periférica, uma alíquota de sangue de todas as puérperas para que fossem feitos os testes de rotina VDRL e HIV. Desse modo, após a centrifugação e resultado negativo do sangue analisado, os técnicos adicionaram aproximadamente 1 mL do soro restante em tubos de polipropileno recoberto com papel alumínio e identificados com os respectivos códigos de registro na pesquisa, data e hora. Posteriormente, os tubos foram acondicionados em freezer (-20 °C) para que somente após a assinatura das mulheres do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE C), estes fossem levados ao Laboratório de Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição – LABAN, localizado no Departamento de Bioquímica do Centro de Biociências da UFRN.

As amostras biológicas das parturientes que não se encaixavam nos critérios de inclusão bem como aquelas oriundas de mulheres que não concordaram em participar do estudo, foram na sequência, imediatamente descartadas.

- Momento 2: *PARTO* (Figura 2).

Na sala de parto, a equipe (enfermeiros e médicos obstetras) de plantonistas do hospital coletou o sangue de cordão umbilical (aproximadamente 5 mL) em tubos de polipropileno recoberto com papel alumínio e identificados com os respectivos códigos de registro na pesquisa, data e hora. Após a centrifugação do sangue de cordão umbilical, os técnicos do laboratório adicionaram aproximadamente 1 mL do soro em tubos recobertos com papel alumínio e os acondicionaram em freezer, para que somente após a assinatura das mulheres no TCLE, estes pudessem ser levados ao LABAN da UFRN.

Novamente, as amostras biológicas que não se encaixavam nos critérios de inclusão bem como aquelas oriundas de cordão umbilical de mulheres que não concordaram em participar do estudo, foram completamente descartadas.

- Momento 3: PÓS-PARTO IMEDIATO (Leite 0h) (Figura 2).

Já na enfermaria, as mulheres foram abordadas por um dos pesquisadores, sempre no período matutino. Aquelas selecionadas que concordaram em participar do estudo, assinaram o TCLE, após a sua leitura e explicação. Nos casos em que a mulher era iletrada, o entrevistador explicou os objetivos da pesquisa e a confiabilidade dos dados, com a leitura do TCLE em voz alta, sendo o seu consentimento obtido pela impressão digital. As voluntárias receberam identificação de participação no prontuário hospitalar, todavia, foi explicitada para a equipe do hospital, bem como para as voluntárias, a possibilidade de desistência da participação em qualquer momento do estudo. Após este procedimento, as mulheres foram aleatoriamente designadas para integrarem um dos quatro grupos do presente estudo (Quadro 3). Esta estratégia permitiu a comparação entre as posologias de 200.000 UI e 400.000 UI (200.000 UI + 200.000 UI), bem como permitiu verificar se o momento de administração no pós-parto poderia influenciar nas concentrações de retinol no leite materno nas primeiras 12 semanas pós-parto.

Os grupos de intervenção foram divididos, conforme apresentados a seguir:

Quadro 3. Grupos de intervenção e esquema de suplementação materna com VA

Grupos	Via de administração da VA	Esquema de suplementação	Total
G200(0H)	Oral	200.000 UI de VA no pós-parto imediato	200.000 UI de VA
G200(4S)	Oral	200.000 UI de VA 4 semanas pós-parto	200.000 UI de VA
G400(24H)	Oral	200.000 UI de VA no pós-parto imediato + 200.000 UI de VA 24h pós-parto	400.000 UI de VA
G400(1S)	Oral	200.000 UI de VA no pós-parto imediato + 200.000 UI de VA na 1ª semana pós-parto	400.000 UI de VA

Posteriormente, todas as mães, exceto as do grupo G200(4S), receberam a 1ª cápsula contendo 200.000 UI de VA, após coleta de aproximadamente 1 mL de leite colostro materno (leite 0 h).

- Momento 4: 24H PÓS-SUPLEMENTAÇÃO (Leite 24h) (Figura 2).

Ainda na enfermaria, passadas 24 horas da 1ª coleta de leite, uma nova alíquota (≈ 1 mL) de leite colostro foi obtida das participantes dos quatro grupos (leite 24 h), seguindo-se de nova administração oral de cápsula de VA (200.000 UI de VA), fornecida exclusivamente para as mulheres do grupo G400(24h).

- Momento 5: 1 SEMANA PÓS-PARTO (Figura 2).

Uma semana após o parto, em retorno das mulheres ao hospital para a realização de testes da rotina assistencial hospitalar ao bebê, foi coletada nova alíquota (3 mL) de leite materno de todas as participantes, seguindo-se de administração, via oral, de cápsula de VA (200.000 UI de VA), apenas para as do grupo G400(1S).

Todas as participantes foram incentivadas a retornar ao hospital, 4 semanas após o parto para novo encontro com os pesquisadores.

- Momento 6: 4 SEMANAS PÓS-PARTO (Leite 4 semanas) (Figura 2).

Quatro semanas após o parto, em retorno ao hospital, foi coletada nova alíquota (3 mL) de leite materno. Posteriormente, a administração via oral de cápsula de VA (200.000 UI de VA) foi efetuada exclusivamente às mulheres do grupo G200(4S). Todas as participantes foram incentivadas a retornar ao hospital, 12 semanas após o parto para nova coleta de informações.

- Momento 7: 12 SEMANAS PÓS-PARTO (Leite 12 semanas) (Figura 2).

Em novo encontro com a equipe da pesquisa, a última alíquota (3m L) de leite foi coletada das voluntárias.

A cada encontro com o pesquisador, no intuito de se evitar o desmame precoce, as mulheres foram incentivadas quanto à manutenção do aleitamento materno exclusivo e esclarecidas sobre as vantagens deste tipo de aleitamento.

A figura 2 mostra de forma esquemática o fluxo de coletas (sangue e leite) e intervenção nos seus respectivos momentos de segmento.

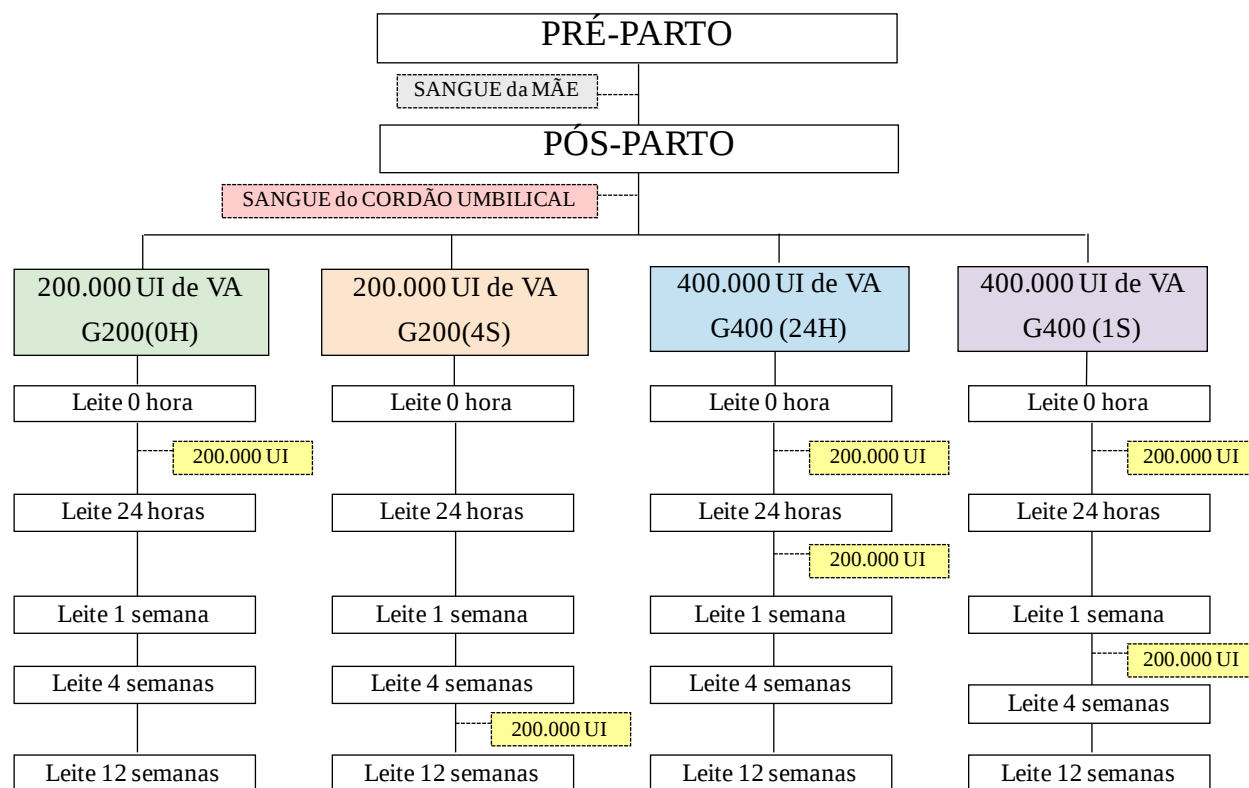


Figura 2 – Esquema de distribuição dos partícipes, momentos das coletas (sangue e leite) e de intervenção.

4.6 DADOS BIOQUÍMICOS

4.6.1 Coleta do material biológico

- **Sangue materno e sangue de cordão umbilical:** Foram colhidos, por técnico capacitado, aproximadamente 5 mL de sangue venoso materno, antes do parto e 5 mL do sangue do cordão umbilical dos neonatos (ordenha), imediatamente após o parto. As amostras de sangue foram

coletadas em tubo de polipropileno recoberto com papel alumínio para proteção contra a luz. Após cada coleta, o tubo com sangue foi devidamente tampado e transferido para centrífuga, permanecendo em descanso por um tempo médio de 20 minutos, enquanto ocorria a retração do coágulo. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1073 G, para a separação do soro, quando se retirou uma alíquota de 1 mL de cada amostra, armazenando-a em freezer à temperatura -20°C para posterior transporte, em caixa térmica com gelo, ao LABAN-UFRN, onde as amostras foram analisadas para a extração do retinol sérico.

- **Leite materno:** Nas manhãs em que ocorreram os encontros entre os pesquisadores e as mulheres voluntárias, o auxiliar de pesquisa, solicitou à mãe (em jejum noturno) que colocasse o bebê para mamar em uma das mamas para estimular a ejeção de leite, seguindo-se da coleta (por ordenha manual) de leite materno da outra mama não sugada, mantendo-se um intervalo de, pelo menos, 2 horas entre a última mamada e a coleta da amostra. A primeira ejeção do leite foi desprezada para evitar flutuações no teor de retinol e gordura. As amostras possuíam aproximadamente 1 mL de leite colostro e as alíquotas foram coletadas em tubos de polipropileno protegidos da luz e devidamente identificados com códigos de registro na pesquisa, data e hora. Imediatamente após cada etapa de coletas, as amostras de leite materno foram transferidas para o freezer (-20°C), sendo posteriormente transportadas ao Laboratório de Bioquímica da UFRN em caixa térmica com gelo.

4.6.2 Extração do retinol

- **Soro (materno e de cordão umbilical):** O procedimento extrativo ocorreu segundo o método modificado de Ortega et al. (1997). Após o descongelamento do soro, foi adicionado 1 mL de álcool etílico 95% (Vetec®) para a precipitação das proteínas, e retinol acetato como padrão interno (Sigma®). Em seguida, as amostras foram agitadas por 1 minuto, no agitador de tubos, em velocidade contínua, e centrifugadas à 1073 G, durante 10 minutos. A amostra foi extraída em três etapas com a adição de 2 mL de hexano (Merck®) em cada etapa. Após cada adição de hexano, as amostras foram agitadas durante 1 minuto e centrifugadas à 1073 G por 10 minutos, sendo a camada hexânica sobrenadante removida para tubo de vidro com capacidade para 5 mL.

Em sequência, uma alíquota de 3 mL da fase hexânica foi evaporada em banho-maria a 37 °C. O resíduo da amostra foi redissolvido em 500 µL de metanol (Vetec®) com grau de pureza para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), agitado durante 1 minuto e deste, retirados 20 µL para aplicação e leitura em cromatógrafo.

- **Leite materno:** O retinol no leite materno foi dosado, obedecendo ao método modificado de Giuliano et al. (1992). Após descongelamento das amostras de leite, em banho de água a 37 °C com agitação de 60 oscilações por minuto, houve uma saponificação alcalina com hidróxido de potássio (1 mL) a 50% v/v (Vetec®), no intuito de hidrolisar os ésteres de retinil. Ao mesmo tempo foi adicionado álcool etílico 95% em igual volume ao da amostra, para desnaturação das proteínas. As amostras foram homogeneizadas durante 1 minuto em agitador de tubos, e submetidas ao banho-maria sob agitação a 45 °C por duas horas. Posteriormente, foram adicionadas às alíquotas, 2 mL de hexano como reagente extrativo, agitando-se durante 1 minuto para posterior centrifugação à 1073 G por 10 minutos. O sobrenadante hexânico foi removido para outro tubo e no precipitado foram adicionados mais 2 mL de hexano, repetindo-se o processo extrativo por 3 vezes no total. Uma alíquota de 3 mL da fase hexânica foi evaporada em banho-maria a 37 °C. Os extratos foram dissolvidos em 500 µL de metanol (Vetec®) em grau de pureza para CLAE, agitados durante 1 minuto e 20 µL da solução foram analisados em CLAE.

4.6.3 Condições cromatográficas e quantificação do retinol

As concentrações de retinol de todas as amostras (soro materno, soro de cordão umbilical e leite materno) foram determinadas em cromatógrafo da marca Shimadzu®. O equipamento é constituído de bomba LC-20 AT Shimadzu, acoplado a um Detector SPD-20A Shimadzu UV-VIS, Coluna Shim-pack CLC-ODS (M) 4,6mmx15cm e computador com programa LC solution (Shimadzu Corporation®) para processamento dos dados. A fase móvel utilizada para a análise de retinol foi metanol 100%, em sistema isocrático com fluxo de 1 mL/min e tempo de retenção de 4,2 minutos. O comprimento de onda adotado para monitoramento da absorbância foi de 325 nm. A identificação e a quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação da respectiva área do pico obtido no

cromatograma com a área do padrão de retinol (Sigma®). As concentrações dos padrões foram confirmadas por meio do coeficiente de extinção específico para retinol em etanol absoluto (ϵ 1%, 1 cm = 1.780 a 325 nm).

4.6.4 Precisão e exatidão dos métodos

A exatidão e precisão dos métodos (ORTEGA et al. 1997 e GIULLIANO et al., 1992) modificados foram avaliadas através dos testes de recuperação da extração e de repetitividade, respectivamente.

- **Teste de recuperação:** Três grupos de amostras: G1 (apenas leite), G2 (leite e padrão de retinol de concentração conhecida), G3 (água e padrão de retinol de concentração conhecida) foram extraídas em triplicata e aplicadas em CLAE nas mesmas condições antes descritas para cada um dos métodos. Os resultados mostraram que a extração do retinol foi eficaz, com uma recuperação do retinol de 98%.
- **Teste de repetitividade:** três alíquotas de uma mesma amostra de leite, de soro materno e de soro de cordão, foram extraídas como descritas anteriormente (item 4.6.2) em três dias alternados, seguindo-se de dosagem em CLAE. O coeficiente de variação obtido foi inferior a 4%.

4.6.5 Classificação do estado nutricional de vitamina A

O retinol do colostro e dos soros materno e do cordão umbilical foi utilizado para expressar o estado nutricional de VA materno e dos neonatos. Além disso, o retinol do leite materno foi utilizado para avaliar o efeito da suplementação materna com megadose de VA administrada no pós-parto, quanto ao incremento de retinol nas concentrações de VA no leite materno. Visto não haver ponto de corte definido para a inadequação do status de VA a partir do colostro, consideramos que concentrações de retinol no colostro inferiores ao ponto de corte

estabelecido para o leite maduro (1,05 $\mu\text{mol/L}$) (WHO, 1996), poderiam ser sugestivos de deficiência subclínica de VA, uma vez que o colostro naturalmente tem mais retinol que o leite maduro (MACIAS; SCHWEIGERT, 2001). No soro materno, concentrações de retinol inferiores a 0,7 $\mu\text{mol/L}$ configuraram DVA (WEST Jr, 2002, RICE; WEST Jr; BLACK, 2004). Quanto ao soro do cordão umbilical dos recém-nascidos, as concentrações de retinol menores que 0,70 $\mu\text{mol/L}$ foram classificadas como baixo status de VA (GODEL, et al., 1996).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas dos dados, foi utilizado o software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 20.0. As amostras foram submetidas ao teste Kolmogorov smirnov para verificar o seu acoplamento à distribuição normal. Nos casos de normalidade da distribuição, para as variáveis contínuas, os dados foram analisados descritivamente na forma de média e desvio padrão; nos casos de distribuição assimétrica, os resultados foram descritos como a mediana (amplitude interquartil: p25 – p75). As variáveis categóricas foram apresentadas em porcentagem (%).

Os testes “t” de Student independentes ou pareados e a análise de variância (ANOVA) ou os seus respectivos correspondentes não paramétricos, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, foram usados na análise de comparação de médias entre as variáveis do estudo. Para avaliar a relação entre as variáveis numéricas contínuas, foram utilizados os testes de correlação linear de Pearson ou Sperman e para verificar diferenças entre proporções, foram criadas tabelas de contingência e em seguida aplicado o teste Qui-quadrado de Pearson (χ^2).

Nas comparações com os grupos de estudo, a fim de conhecer os efeitos das variáveis independentes nas concentrações de retinol no leite materno, foi realizada uma análise tipo *Generalized Estimed Equation* (GEE) com função ligante linear, matriz de correlação de trabalho auto-regressiva (AR-1), teste de hipótese de Wald e post hoc de Bonferroni.

Em todos os casos os resultados foram considerados estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da UFPE, de acordo com as normas contidas na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Brasil/MS, 1996), sendo aprovado sob o número 476/10 (CAAE- 0471.0.172.172-10) em 03 de fevereiro de 2011 (ANEXO – C).

Como todas as mulheres receberam suplementação ainda dentro do período de cuidados/atenção pós-parto oferecido pelo hospital-maternidade, estas foram orientadas a retornarem ao hospital, caso eventos adversos ocorressem com elas e/ou seus bebês, em um período de até três dias após cada suplementação. Todavia, não foram identificados, em nenhum dos grupos de intervenção, casos de cefaléia, vômitos, abaulamento de fontanela, ou quaisquer outras adversidades típicas de intoxicação materna ou infantil após suplementação com megadoses de VA.

5 RESULTADOS

Os resultados gerados por este estudo estão sob o formato de 02 artigos científicos originais apresentados em concordância às normas das respectivas revistas nas quais estes foram submetidos para publicação.

5.1 ARTIGO I

Artigo original enviado para *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*:

Vitamin A deficiency and associated factors in the mother-newborn pairs

*Danielle Soares Bezerra, ‡Karla Danielly da Silva Ribeiro, ‡Jeane Franco Pires Medeiros,
‡Mayara Santa Rosa Lima, ‡Roberto Dimenstein, and §Mônica Maria Osório

From the *Department of Nutrition, School of Health Sciences of Trairi, ‡Department of Biochemistry, Bioscience Centre, Federal University of Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Brazil and §Postgraduate Program in Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Address correspondence and reprint requests to Danielle Soares Bezerra, Department of Nutrition, School of Health Sciences of Trairi – Federal University of Rio Grande do Norte, Santa Cruz, Rio Grande do Norte, Brazil. E-mail: daniellesbezerra@yahoo.com.br. Fax: +55 84 32912411.

Author contribution

D. S. Bezerra: Substantial contributions to the conception and design of the work, acquisition, analysis and interpretation of data for the work; Drafting the work and revising it critically for important intellectual content; Final approval of the version to be published; Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

K D. da S. Ribeiro, J. F. P. Medeiros and M. S. R. Lima: Substantial contributions to the acquisition and analysis of data for the work; Revising it critically for important intellectual content; Final approval of the version to be published; Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

R. Dimenstein and M. M. Osório: Substantial contributions to the conception or design of the work and interpretation of data for the work; Revising it critically for important intellectual content; Final approval of the version to be published; Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Participating Investigators

Collected data: Karoline Queiroz Martins Almeida de Araújo, Monalisa Soares Maranhão de Freitas Medeiros, Flávia Andréia Pereira Soares dos Santos.

Financial Support: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) of Brazil (File nº 472021/2011-7). However, the funder institution has had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Abstract

Objective: The purpose of this study was to assess the vitamin A (VA) nutritional status of women and their newborns in the a Brazilian Northeast city and determine the association between retinol in the maternal serum, umbilical cord blood and colostrum milk, as well as to evaluate the relationship between retinol concentrations in the biological samples and socio-demographic and obstetric variables.

Methods: The VA nutritional status in 65 pairs of women and newborns was assessed from samples of the mother's serum, umbilical cord serum and colostrum milk using a high-performance liquid chromatography method. Appropriate estimation methods and statistical tests were applied for discrete and continuous variables.

Results: The prevalence of inadequate maternal VA status was 21.5% (95% CI: 11.5% - 31.5%) and 13.8% (95% CI: 5.4% - 22.2%) based on maternal serum and colostrum concentrations, respectively. Among newborns, 41.5% (95% CI: 29.3% - 53.5%) presented a low status of VA concentrations based on cord serum. Newborns were more likely to be a low status if born to mothers with Vitamin A Deficiency (VAD) versus adequate serum retinol (odd ratio: 8.02, 95% CI: 1.9 – 32.8). Retinol in maternal serum was lower in mothers less educated ($p = 0,04$) and colostrum retinol concentrations were lower in primiparous ($p = 0,002$).

Conclusions: VAD mothers is common among public hospital attenders in Northeast Brazil and this problem is associated with delivering a low status of VA in newborns. Maternal parity and educational level were related with the maternal VA status. The findings pointed out the need to adopt control actions against VAD in this population.

Keywords: vitamin A; serum; umbilical cord; colostrum; high performance liquid chromatography.

Summary box: Vitamin A deficiency (VAD) is a public health problem in many parts of the world. Needy communities, like that from the Brazilian Northeast, must be the focus of studies which makes it possible the mapping and identification of factors that are related or contribute to this occurrence in populations at risk. In this study, VAD was a common problem in mothers and was associated with delivering a low status of VA in newborns. Maternal parity and educational level were related with the maternal VA status. The findings pointed out the need to adopt control actions against VAD in this population.

Introduction

Vitamin A (VA) plays essential but distinct roles regarding the functions it performs, including the vision, normal cell differentiation, embryonic growth and development, skeletal growth, immune response, and reproduction (1).

Due to the importance of VA to human health, vitamin A deficiency (VAD) during pregnancy is related to prematurity, pregnancy hypertensive syndromes, puerperal sepsis, anemia in pregnancy, oxidative stress, and higher odds of miscarriage. These problems contribute, directly or indirectly, to increase the morbidity and mortality rates of mothers and infants in their first months of life (2). Globally, estimates based on the serum retinol indicator suggest that in the period 1995-2005, VAD hit 33.3% (190 million) children below 5 years of age, and that approximately 15.3% (19.1 million) pregnant women also had VA concentrations deemed deficient (3).

In Brazil, VAD is deemed a moderate public health problem (3), where 17.4% of children and 12.3% of women in childbearing age has deficient levels of VA. The highest prevalence is found in the Northeast (19.0%) and Southeast (21.6%) regions of the country (4). In the

Brazilian Northeast context, many publications (5,6,7,8) have showed high probability to occur this kind of deficiency among women attended in public hospitals in this region, which suggests that VAD can result in serious prejudice for women health and their babies on first days after childbirth. Faced with these circumstances, it is important having studies to assess the VA nutritional status of populations at risk of developing VAD, such as those in the Brazilian Northeast. So, this study aims to analyze the vitamin A nutritional status in women and their newborns in the Brazilian Northeast from different perspectives (maternal serum, umbilical cord serum and colostrum milk) and determine the association between retinol concentrations and some socio-demographic and obstetric variables.

Methods

Population and study characterization

This is a cross-sectional study conducted with pairs of mothers and children delivered at a children's hospital: University Hospital Ana Bezerra, located at Santa Cruz municipality– Rio Grande do Norte (RN), Brazilian Northeast. This municipality is located 115 km from Natal, capital of the State of RN. The territorial area of Santa Cruz is 624.36 km², with a population of 38,142 inhabitants, and a demographic density of 57.33 inhabitants per km². The population lives predominantly in the urban area. Their economy is mainly based on services (9).

Sample calculation

To calculate the sample size, it was used the total number of individuals needed to get a reliable estimate of the population mean. The basic parameters used were the critical value that corresponds to the desired confidence level, the expected standard deviation for the variable studied and the maximum permissible error.

Assuming that standard deviations for retinol in the colostrum, in the maternal serum, and in the serum of the newborn (umbilical cord) would not exceed 1,01 $\mu\text{mol/L}$ (8), 0,38 $\mu\text{mol/L}$ (8), and 0,93 $\mu\text{mol/L}$ (10), respectively, therefore, it would be necessary to recruit at least 63 mother-children pairs, since this was the number estimated to maternal milk, substrate that has the highest variability among the types of sample. The maximum estimated error would be 0.25 $\mu\text{mol/L}$ at a 5% significance level.

Selection of participants

This study, approved by the Committee of Ethics on Research with Human Beings of the Federal University of Pernambuco (File No. 476/10; CAAE- 0471.0.172.172-10) and by the Research Commission of University Hospital Ana Bezerra (venue of the screening of the mother-child binomial), was performed accordingly to the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. All women signed an informed consent to participate in the study.

The selection of the 65 participants of the study happened at the moment of their admission for delivery, according to the spontaneous demand of the maternity hospital, and adopted the following inclusion criteria: women 18-40 years of age and low obstetrical risk. As exclusion criteria, the following parameters were considered: women with diabetes, hypertension, neoplasias, gastrointestinal tract (GI tract) and liver diseases, cardiopathies, syphilis and HIV+ and remaining infectious diseases, mental disorders, and women who had multiple and/or malformed fetuses, and used vitamin supplements containing VA during pregnancy. Regarding the children, premature babies (less than 37 weeks) or those with mental paralysis and malformation of the GI tract, heart or lungs were not part of the survey.

Biochemical evaluation of retinol

In order to determine the serum concentrations of retinol, at the moment women were being prepared for the delivery (when collecting samples for VDRL and HIV tests), 5 mL of blood sample was drawn from the parturients via brachial venipuncture. The neonates underwent umbilical cord blood milking, immediately after delivery. After being collected, blood samples were centrifuged (at 1073 G) to separate and extract the serum.

An aliquot (1 mL) of the colostrum was collected in the first morning after delivery, after a night fasting, by manual pumping of one single breast, at time intervals of at least 2 hours between the last breastfeed and the sample collection.

All samples (mother's serum, umbilical cord serum, and colostrum) were stored in polypropylene tubes after being sterilized and covered with aluminum paper for protection against the light. Then, the samples were frozen at -20 °C and shipped to the Food and Nutrition Biochemistry Lab of the Federal University of Rio Grande do Norte, in the city of Natal-RN.

For the analysis of retinol, the serum samples were extracted by adapting the method described by Ortega et al. (1997) (11), as follows. For 1 mL of serum, 1 mL of ethanol 95% (Vetec®) was used to precipitate the proteins, followed by three steps of extraction with 2 mL of hexane (Merck®) added in each step. After adding hexane each time, the samples were agitated during 1 minute and centrifuged at 1073 G for 10 minutes. Then, the resulting hexane sample was removed to another tube. An aliquot of 3 mL of the hexane phase was evaporated under a nitrogen atmosphere in water bath at 37 °C. In order to extract retinol from the colostrum, a saponification step was added to the above mentioned method with 1 mL of potassium hydroxide 50% v/v (Vetec®) (12).

After this process, all extracts resulting from samples of serum and colostrum were dissolved again in 500 μL of methanol (Vetec®) with purity grade for high-performance liquid chromatography (HPLC), and 20 μL were applied to the chromatographer (Shimadzu®) to quantify the existing retinol. The mobile phase used for the analysis of retinol was methanol at 100% in an isocratic system, with a 1 mL/min flow, and a retention time of 4.2 minutes. The wavelength adopted for the monitoring of absorbance was 325 nm. The identification and quantification of retinol in the samples were established by comparing the respective peak area obtained in the chromatogram to the retinol standard area (Sigma®). The concentrations of the standards were confirmed by the extinction coefficient specific to retinol in absolute ethanol (ϵ 1%, 1 cm = 1,780 at 325 nm).

The retinol found in the colostrum, in the maternal serum and in the umbilical cords of the newborns were presented in $\mu\text{mol/L}$ and used to express the VA nutritional status of the mothers and neonates. It is known that colostrum has more retinol than mature milk (13), however there is no cut-off point defined to identify an inadequate status of vitamin A in the colostrum. So, the authors assumed that retinol concentrations in colostrum lower than the cut-off point defined to the mature milk (1.05 $\mu\text{mol/L}$) (14) would be suggestive to indicate a subclinical vitamin A deficiency (DVA). When considered the maternal serum, retinol concentrations less than 0.7 $\mu\text{mol/L}$ configured VAD (15,16). As to the serum of the umbilical cords of newborns, retinol concentrations less than 0.70 $\mu\text{mol/L}$ were classified as a low status (17).

Variables of interest

In order to characterize the sample, socio-demographic information on the women's prenatal period, delivery and clinical history was obtained by interviewing the puerperae and via

information collected from their hospital medical records and from their prenatal follow-up cards.

Among the variables possibly related to the immediate causes of the nutritional status of the studied group, the following details were included biological/obstetric (anthropometric gestational nutritional status and parity) and socio-demographic information (mother's age range, number of individuals per household, mother's education level and family income).

The classification of the women's gestational anthropometric status was done according to the critical levels of the Body Mass Index (BMI) for the gestational ages, as proposed by Atalah et al. (1997) (18), and adopted by the Brazilian Ministry of Health (19). The anthropometric assessment related to their pregnancy was based on the information of their last antenatal care visit. For the anthropometric classification of the neonates, those who had less than 2,500 g were considered in a low weight condition at birth (20). Cases of maternal anemia during pregnancy were identified from hemoglobin (<11 g/dL) and hematocrit ($< 33\%$) results (21). All of the collected information was registered in questionnaires and pre-coded and pre-tested forms.

Statistical analyses

As to the statistical analyses of the data, the software "Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 20.0 was used. The variables were submitted to Kolmogorov-Smirnov's test to evaluate their coupling to the normal distribution. For the symmetrical distribution variables, the results were arranged as average (standard deviation); in the cases of asymmetrical distribution, the results were described as the median (interquartile amplitude).

In order to evaluate the relation among the continuous numerical variables (retinol in the colostrum x retinol in the maternal serum x retinol in the serum of the umbilical cord), Pearson's and Sperman's linear correlation tests were used, in accordance with the pertinence of each case.

In order to assess the relation between the VA nutritional status of the mothers and their infants by means of the cut-off points of indicators maternal serum, serum of the umbilical cord and colostrum, contingency tables were created and a chi-square (χ^2) test was applied to check the differences between these proportions. In addition, comparison tests were done for the retinol averages between groups of variables set for the socio-demographic and obstetric conditions of the mother-child group. For this purpose, Student's "t"-tests and the Analysis of Variance (ANOVA) or the non-parametric correspondence, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis, respectively, were used. In all cases, the results were considered statistically significant for $p < 0.05$.

Results

The participants of this study had a mean age of 24.8 (5.4) years of age, and 69.2% of them were in the range from 21 to 35 years of age (Table 1). The assessment of the socio-demographic characteristics determined that most of the participants were married or lived with their partners (81.5%), had a low education level (56.3% had only the primary or middle school level) and low income (78.1% had an income up to one average minimum monthly salary of US\$ 243.14 during the studied period). Regarding the obstetric characteristics, there was a predominance of vaginal delivery (84.6%) and that most of the women (70.8%) had two or more children (parity average = 1.7 children).

According to the mother's anthropometric nutritional status during the gestational period, 38.1% of them had eutrophia. Not all women had the register of the hematological exams realized during the gestational period, but among those who had the results registered more than 86% was not anemic. Regarding the newborns, the predominant gender was male (58.5%), and

the birth weight of most of them was considered adequate (96,9%). Maternal breastfeeding was given in the immediate postpartum to 87.7% of the neonates.

The measurements of central tendency of retinol and prevalence of inadequacy of retinol status based on the results in the indicators maternal serum, serum of the newborn (umbilical cord) and colostrum are presented in Table 2. No relation was found between the median of retinol concentrations in the colostrum and the retinol averages in the maternal serum ($r = -0.20$; $p = 0.12$) or in the serum of the umbilical cord ($r = 0.02$; $p = 0.90$). However, it was showed a significant linear relation between the averages of retinol found in the maternal serum and the serum of the umbilical cord ($r = 0.34$; $p = 0.006$).

In addition, the distribution over the different cut-off points for the classification of the mother-child VA nutritional status highlighted that infants whose mothers have deficient serum retinol concentrations ($<0.70 \mu\text{mol/L}$) were at higher odds to have low retinol concentrations in the serum of their umbilical cords (odds ratio: 8,02; 95% CI: 1,96-32,75) (Table 3).

There was no statistical difference among groups when considered the anthropometric nutritional status in the mothers and their newborns, either through the retinol concentrations in the maternal serum, serum of the umbilical cord and colostrum ($p > 0,05$) (Table 4). Furthermore, there was no significant difference in measurements of central tendency of retinol when the concentrations in biological samples (maternal serum, serum of the umbilical cord and colostrum) were compared among groups of the most of socioeconomic variables (maternal age, marital status, number of individuals per household and family income) ($p > 0,05$). However, when analyzed the educational level, the results pointed significant statistical difference between groups in the biological samples of maternal serum ($p = 0.04$) and colostrum ($p = 0.01$). Similar result was found when the retinol concentration in the colostrum was evaluated according to the

parity ($p = 0.002$). In addition, it was identified a significant association between educational level and parity ($p < 0.001$), so that women who had a lower educational level were those who had a higher number of children (results not presented). The mothers who brought together both conditions were those who presented the highest values to retinol in the colostrum (Table 4).

Discussion

Due to the impact of VAD in the health of the populations, especially the mother-child group, the assessment of the VA nutritional status in individuals of communities not yet investigated is very important, particularly in disadvantaged areas like the municipality of Santa Cruz, Brazilian Northeast. In these regions, the detection of cases of deficiency, especially by means of reliable indicators, becomes essential to decide on the intervention strategies.

In this research, despite the average concentration of retinol in the maternal serum indicates adequacy and is compatible with other literature findings (22,23,24), substantial part of the maternal population presented VAD, which emphasize an important risk to women health and their infants. To evaluate the VA status in neonates, there is a predominant number of studies in the literature which use $<0,7 \mu\text{mol/L}$ as the cut-off point to suggest a low retinol concentration (10,25,26,27,28,29), and this was the value also adopted as the cut-off point in the present study. The average identified here ratifies the findings of other studies (22,23,24,30), in which the values found are deemed typical for the full-term and healthy newborn, and within the expected estimates for developing countries (0% to 89%) (31). For some authors, part of the explanation for the higher proportion of low values in the developing regions may be due to the higher rates of preterm deliveries and low birth weight (31). Nevertheless, in this research, prematurity was considered one of the exclusion criteria, and low birth weight was found in only

two (1,3%) neonates; therefore, it is not a determining factor for the high prevalence of serum concentrations of retinol below 0.70 $\mu\text{mol/L}$, as found here. Even in countries not known for their VAD, a significant number of children are born with retinol concentrations $<0.70 \mu\text{mol/L}$, thus, this value is not uncommon, and its use as a deficiency indicator requires more validation (32), since it can be overestimating the number of inadequacy cases.

The retinol concentrations found in the umbilical cord of newborns were lower than maternal concentrations and the average retinol value in the umbilical cord corresponds to 62.1% of the average concentration of maternal serum retinol, which is consistent with previous investigations (17,23,33). Shirali et al. (1989) (34) found a logarithmic relationship between the concentrations of maternal retinol and retinol in the umbilical cord of the newborns in a study assessing VA serum concentrations in the mother-child binomial of an Indian population, suggesting a saturable transplacental transport of VA. The fetal concentration of VA seems to be stable despite the variations in the maternal status and intake of VA (35). In this sense, even if the mothers have adequate VA reserves, such as what happens in developed countries, VA liver stocks in the newborn are found physiologically low, considering their requirements for the post-natal period, and VA is only sufficient for the first days of life (36). However, the regulation mechanisms that sustain homeostasis remain obscure, and it is not yet known if these mechanisms may successfully offset an extreme deprivation or excess of VA (35).

When was verified the relation between the retinol nutritional status of these neonates (umbilical cord) and the retinol nutritional status of the mothers, it was clear that newborns of women with VAD were at 8.02 times higher odds to present low retinol levels in the serum of the umbilical cord. This association corroborates the literature, suggesting that when there is

maternal VAD, the risk for the newborn to present the deficiency is high, and this may have great impact on their immunological system and in the child morbidity and mortality rates (3,33).

However, in case the mother uses a diet intake or adequate VA liver reserves, such as the production of milk in sufficient volumes and adequate concentrations of VA, the VA liver stock in the newborn may be increased during the breastfeeding period (37). This is why the first months of life of a baby are considered critical for accumulating VA reserves at levels sufficient to prevent VAD in the post-weaning period (32). In this context, diagnosing the VA content in the breast milk provides information about the mother's nutritional status, and about the relevant micronutrient that goes to the baby. For these reasons, concentration of VA in the human milk is an important indicator and has been used for investigations on VAD in the mother-child group (38).

In the present research, retinol concentrations in the colostrum were compatible with the values in the breast milk found in developing countries (2.1 - 3.5 $\mu\text{mol/L}$) (38). It is expected that the VA concentrations in the colostrum are usually high (39,13), which was confirmed in the results presented here. This is the main cause to explain that the median value in the colostrum was higher than the cut-off point of 1.05 $\mu\text{mol/L}$ (14,40), however, this does not mean that these values will remain, after the subsequent lactation periods are reached, as, with time, there is a remarkable drop in the VA levels of the breast milk (41).

When we evaluated the retinol prevalence based on the cut-off point ($<1.05 \mu\text{mol/L}$) adopted to the colostrum, 13.8% of the maternal population presented values below this cut-off point, which represents an important risk to infant health, since VA concentrations in maternal milk of at least 1.05 $\mu\text{mol/L}$ are required to attend the metabolic necessities of the babies but are not enough to accumulate reserves in the liver, so that is considered the minimum VA

concentration to prevent VAD in the first six months of infant's life (14). It is worth to note that this situation is more worrying if it is considered that, in function of the inexistence of an specific cut-off point to the colostrum, it was adopted the cut-off point to the mature milk (1,05 $\mu\text{mol/L}$) to evaluate the retinol status even in the beginning of the lactation, when VA concentrations are naturally high (39,13). Then, based on the results it is possible to speculate that an even greater problem would be more evident in nursing mothers from this region if the cut-off point were increased to take into consideration the natural characteristic of the higher VA concentrations in the first days after delivery.

In view of the above, the diagnosis of the factors which are related to the VA status can help to identify the conditions that possibly modulate retinol in the mothers and may guide preventive measures against VAD for the most vulnerable groups. The literature suggests that some of the nutrition-related factors, the obstetrical and socioeconomic/demographic profile may all have an impact on the concentration of retinol, however, there is not yet full agreement about this relations (8,33,42,43,44).

In this sense, even though the results have pointed that retinol in the maternal serum was higher in the group of women who had higher educational level ($p = 0.04$) and is known that factors as educational level can interfere in the nutritional knowledge and dietary behavior (45), what can impact consequently the nutritional status of the individuals, in the present investigation was observed that the retinol in the colostrum was higher in the group of women with a low educational level ($p = 0.01$), with a stronger statistical significance in the last finding (colostrum), what can indicate a greatest power of evidence. It was also found a relationship between the retinol levels in the colostrum and maternal parity, aspect that corroborates with literature achievements which suggest that parity may have an influent effect on retinol levels in

the milk, as previous lactation enables high mobilization of retinol reserves and their high rates of transfer to the mammary gland (46). In this context, it is worth highlighting that in the present study, women who had a low educational level had higher parity ($p < 0.001$), what justify why those who had a low educational level had higher retinol concentrations in the colostrum, in contrast to the results identified to the maternal serum. Nevertheless, in view of the problems intrinsically related to dietary, demographic and cultural factors, typical of economically and socially disadvantaged locations, such as the municipality of Santa Cruz, it is believed that the population becomes more vulnerable to the harms of an inadequate family planning, educational level and maternal nutritional status, especially as far as children growth and development are concerned, even if the results found here have been apparently conflicting in some aspects.

Conclusion

The achievements of the present research allow concluding that in a sample those who frequent a public hospital in Brazilian Northeast, VAD is a common problem among mothers and is associated to delivery of newborns with a low retinol concentration in the serum of the umbilical cord. Moreover, maternal parity and educational level were related to the maternal status of VA. These results are very important, since this is a pioneer study in the quantification of the VAD problem in the sole public maternity hospital in Santa Cruz-RN, municipality in Brazilian Northeast.

Considering the results found here, continuous actions to monitor and intervene in the target population are justifiable, such as extending the studies to assess the VA status, the referral of individuals suspicious of having VAD to health services, the maternal supplementation with VA megadoses after delivery, the promotion of breastfeeding, encouragement to adopt a

diversified diet and the consumption and farming of food that is a source of VA and the adoption of educational activities comprising health and nutrition, as well as the adoption of policies to improve the life and health condition of the woman and child, from the beginning of pregnancy, all the way to the lactation period, aiming to prevent this important nutritional deficiency.

Acknowledgements

The authors cordially thank University Hospital Ana Bezerra (HUAB-UFRN) for having allowed this study to be done, to all the women and their newborns who participated in the study on a voluntary basis, and to all those involved in collecting the samples and in the biochemical analyses of the biological samples, as well as to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) of Brazil for their financial support. However, the funder institution has had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

References

01. McLaren DS, Kraemer K, eds: Manual on Vitamin A Deficiency Disorders (VADD). 3 ed. World Rev Nutr Diet. Basel: Karger 2012;103: 33-51.
02. Eigbefoh JO, Okpere EE, Ande B, et al. How useful is the Helen Keller food frequency chart in the determination of the vitamin A status in pregnancy? *J Obstet Gynaecol* 2005;25: 123-127.
03. World Health Organization. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005: WHO global database on vitamin A deficiency. Geneva: WHO; 2009.

04. Brasil. Ministério da Saúde. Centro Brasileiro de Análise e Planejamento. Pesquisa nacional de demografia e saúde da criança e da mulher (PNDS-2006): dimensões do processo reprodutivo e da saúde da criança / National survey on demography and health of women and children (PNDS 2006): dimensions of reproduction and child health. Brasília: Centro Brasileiro de Análise e Planejamento;2009.
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnds_crianca_mulher.pdf
05. Ramalho R A, Anjos LA, Flores H. Hipovitaminose A em recém-nascidos em duas maternidades públicas no Rio de Janeiro, Brasil / Hypovitaminosis A in neonates from public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 1998;14(4):821-827.
06. Accioly E, Souza-Queiroz S. Deficiência de vitamina A em embarazadas atendidas em una maternidad pública en Río de Janeiro, Brasil / Assessment of vitamin A status in pregnant women at a public maternity in Río de Janeiro, Brazil. *Rev. chil. Nutr* 2000;27(3):352-7.
07. Ramalho RA, Flores H, Accioly E, Saunders C. Associação entre deficiência de vitamina A e situação sociodemográfica de mães e recém-nascidos / Association between maternal and newborn vitamin A status and economic stratum in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Assoc Med Bras* 2006; 52(3):170-175.
08. Lira LQ de, Ribeiro PPC, Grilo EC, et al. Perfil de retinol no soro e colostro de puérperas atendidas em maternidade pública brasileira e sua associação com características maternas e obstétricas / Serum and colostrum retinol profile in postpartum women in a Brazilian public maternity and its association with maternal and obstetric characteristics. *Rev Paul Pediatr* 2011;29: 515-520.
09. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE);2014.
<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=241120>

10. Gazala E, Sarov B, HersHKovitz E, et al. Retinol concentration in maternal and cord serum: its relation to birth weight in healthy mother–infant pairs. *Early Hum Devel* 2003;71: 19-28.
11. Ortega RM, Andres P, Martinez RM, et al. Vitamin A status during the third trimester of pregnancy in Spanish women: Influence on concentrations of vitamin A in breast milk. *Am J Clin Nutr* 1997;66: 564-568.
12. Giuliano AR, Neilson EM, Kelly BE, et al. Simultaneous Quantitation and Separation of Carotenoids and Retinol in Human Milk by High-Performance Liquid Chromatography. *Method Enzymol* 1992;213: 391-399.
13. Macias C, Schweigert FJ. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alphotocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann Nutr Metab* 2001;45: 82–85.
14. World Health Organization. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluation intervention programmes. Geneva: WHO;1996.
http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/vitamin_a_deficiency/WHO_NUT_96.10/en/index.html
15. West KP Jr. Extent of vitamin A deficiency among preschool children and woman of reproductive age. *J Nutr* 2002;132: 2857S-2866S.
16. Rice AL, West KP, Jr., Black, RE. Vitamin A deficiency. Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors: Volume 1. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2004.
17. Godel JC, Basu TK, Pabst HF, et al. Perinatal vitamin A (retinol) status of northern Canadian mothers and their infants. *Biol Neonate* 1996;69: 133–139.

18. Atalah ES, Castillo CL, Castro RS, et al. Propuesta de um nuevo estandar de evaluación nutricional em embarazadas / Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women. *Rev Med Chile* 1997;125: 1429-1436.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
http://189.28.128.100/nutricao/docs/geral/orientacoes_coleta_analise_dados_antropometricos.pdf
20. World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: WHO-Technical Reports Series nº 854, 1995.
https://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/10665/37003/1/WHO_TRS_854.pdf
21. World Health Organization. Iron deficiency anaemia. Assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. Geneva: WHO/UNICEF/UNU; 2001.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66914/1/WHO_NHD_01.3.pdf
22. Masters ET, Jedrychowski W, Schleicher RL, et al. Relation between prenatal lipidsoluble micronutrient status, environmental pollutant exposure, and birth outcomes. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1139-1145.
23. Wang YZ, Ren WH, Liao WQ, et al. Concentrations of antioxidant vitamins in maternal and cord serum and their effect on birth outcomes. *J Nutr Sci Vitaminol* 2009;55: 1-8.
24. Beurskens LWJE, Tibboel D, Lindemans J, et al. Retinol Status of Newborn Infants Is Associated With Congenital Diaphragmatic Hernia. *Pediatrics* 2010;126: 712-720.

25. Dimenstein R, Trugo NM, Donangelo CM, et al. Effect of subadequate maternal vitamin-A status on placental transfer of retinol and beta-carotene to the human fetus. *Biol Neonate* 1996; 70: 248.
26. Rondó PH, Abbott R, Tomkins AM. Vitamin A and neonatal anthropometry. *J Trop Pediatr* 2001;47: 307-310.
27. Galinier A, Périquet B, Lambert W, et al. Reference range for micronutrients and nutritional marker proteins in cord blood of neonates appropriated for gestational ages. *Early Hum Dev* 2005;81: 583-593.
28. Barua D, Nasrin B, Nahar KN, et al. Vitamin A Concentration in Cord and Maternal Serum and its Effects on Birth Weight. *Bangladesh J Child Health* 2009;33: 46-49.
29. Nyuar KB, Ghebremeskel K, Crawford MA. Sudanese women's and neonates' vitamin A status. *Nutr Health* 2012;21: 45-55.
30. Dallaire F, Dewailly E, Shademani R, et al. Vitamin A concentration in umbilical cord blood of infants from three separate regions of the province of Quebec (Canada). *Can J Public Health* 2003;94: 386-390.
31. Allen LH, Haskell M. Vitamin A requirements of infants under six months of age. Special Issue on Vitamin A Supplementation and the Control of Vitamin A Deficiency. *Food Nutr Bull* 2001; 22: 214-234.
32. Ross AC. Metabolism of vitamin A in early life. In: Report: WHO technical consultation on vitamin A in newborn health: mechanistic studies. Geneva: WHO; 2012.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503167_eng.pdf
33. Ramalho RA, Flores H, Accioly E, et al. Associação entre deficiência de vitamina A e situação socioeconômica de mães e recém-nascidos / Association between maternal and

- newborn vitamin A status and economic stratum in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Assoc Med Bras* 2006;52: 170-175.
34. Shirali GS, Oelberg DG, Mehta KP. Maternal-neonatal serum vitamin A concentrations. *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 1989;9: 62-66.
 35. Shenai JP. Vitamin A supplementation in newborns: a conceptual framework for biological plausibility. In: WHO technical consultation on vitamin A in newborn health: mechanistic studies. Geneva: WHO~; 2012.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503167_eng.pdf
 36. Underwood BA. Maternal vitamin A status and its importance in infancy and early childhood. *Am J Clin Nutr* 1994;59: 517S-522S.
 37. Sommer A. Vitamin A deficiency and its consequences: a field guide to detection and control. 3rd ed. Geneva: WHO; 1995.
 38. Stoltzfus RJ, Underwood BA. Breast-milk vitamin A as an indicator of the vitamin A status of women and infants. *Bull World Health Organ* 1995;73: 703-711.
 39. Basu S, Sengupta B, Paladhi PKR. Single megadose vitamin A supplementation of Indian mothers and morbidity in breastfed young infants. *Postgrad Med J* 2003;79: 397-402.
 40. Quadro L, Hamberger L, Gottesman ME, et al. Pathways of vitamin A delivery to the embryo: insights from a new tunable model of embryonic vitamin A deficiency. *Endocrinology* 2005;146: 4479-90.
 41. Campos JM, Paixão JA, Ferraz C. Fat-soluble vitamins in human lactation. *Int J Vitam Nutr Res* 2007;77: 303-310.
 42. Mello-Neto J, Rondó PHC, Oshiiwac M, et al. The influence of maternal factors on the concentration of vitamin A in mature breast milk. *Clin Nutr* 2009;28: 178-181.

43. Oliveira JM de, Oliveira NS, Bergamaschi DP. Concentrações de vitamina A no leite humano e características socioeconômicas e nutricionais maternas: resultados de estudos brasileiros / Vitamin A in human milk and socioeconomic and maternal nutritional factors: some results of Brazilian studies. *Rev Bras Saude Mater Infant* 2009;9: 11-20.
44. Dimenstein R, Dantas JC de O, Medeiros ACP, et al. Influência da idade gestacional e da paridade sobre a concentração de retinol no colostro humano / Influence of gestational age and parity on the concentration of retinol in human colostrums. *Arch Latinoam Nutr* 2010;60: 235-239.
45. Vriendt T de, Matthys C, Verbeke W, et al. Determinants of nutrition knowledge in young and middle-aged Belgian women and the association with their dietary behavior. *Appetite* 2009;52: 788-792.
46. Meneses F, Trugo N. Retinol, β -caroteno, and lutein zeaxanthin in the milk of Brazilian nursing women: associations with plasma concentrations and influences of maternal characteristics. *Nutr Res* 2005;25: 443-451.

Table 1- Socio-demographic and obstetric characteristics of mothers and newborns attended in a public hospital in Santa Cruz-RN, Brazilian Northeast (2012-2013).

CHARACTERISTICS	Total (n=65)	%	Mean (SD)
MOTHER			
Age			24.8 (5.4)
18-20 years old	17	26.2	-
21-35	45	69.2	-
>35	03	4.6	-
Marital Status			
Single	12	18.5	-
Married or living with partner	53	81.5	-
Number of individuals per household			3.5 (1.3)
< 4	18	28.1	-
≥ 4	46	71.9	-
Education Level			
Elementary or middle school	36	56.3	-
High school	28	43.8	-
Family Income^a			
≤ 1	50	78.1	-
>1	14	21.9	-
Parity			1.4 (0.5)
Primiparous	19	29.2	-
Multiparous	46	70.8	-
Type of delivery			
Vaginal	55	84.6	-
Caesarean	10	15.4	-
Haemoglobin (g/dL) (n=60)			12.0 (1.2)
<11	08	13.3	-
≥11	52	86.7	-
Haematocrit (%) (n=59)			35.4 (3.1)
<33	08	13.6	-
≥33	51	86.4	-
Gestational Nutritional Status (n=63)			

Low weight	14	12.2	-
Eutrophia	24	38.1	-
Overweight	18	28.6	-
Obesity	07	11.1	-
Breastfed another child during pregnancy (n=65)			
Yes	07	10.8	-
No	58	89.2	-
NEWBORN			
Gestational Age - Weeks (n=63)			39.9 (1.4)
Sex (n=65)			
Female	27	41.5	-
Male	38	58.5	-
Birth Weight (g) (n=64)			
≤ 2,500	02	13.1	
>2,500	62	96,9	-
Exclusive breastfeeding (n=65)			
Yes	57	87.7	-
No	08	12.3	-

SD=Standard deviation. ^aOne Minimum Brazilian Wage = 243.14 US dollars.

Table 2- Retinol concentrations in the colostrum, maternal serum and serum of the newborn (umbilical cord) attended in a public hospital in Santa Cruz-RN, Brazilian Northeast (2012-2013).

Biological Material	Retinol ($\mu\text{mol/L}$)	VAD prevalence (%)
Colostrum	3.10 (1.71 – 5.31) ^a	13.8 ^c
Maternal serum	1.24 (0.58) ^b	21.5 ^d
Serum of the Newborn	0.77 (0.35) ^b	41.5 ^e

^aMedian (p25-p75); ^bMean (SD); ^cSubclinical VAD = Retinol <1.05 $\mu\text{mol/L}$; ^dVAD = Retinol <0.7 $\mu\text{mol/L}$; ^eLow status of VA = Retinol <0.7 $\mu\text{mol/L}$.

Table 3- Association between nutritional status of vitamin A of the mothers and newborn attended in a public hospital in Santa Cruz-RN, Brazilian Northeast (2012-2013).

MOTHERS	NEWBORNS				Total	χ^2	<i>p</i>	OR	CI (95%)
	Cord serum retinol								
	< 0.7µmol/L		≥ 0.7µmol/L						
Serum retinol	n	%	n	%					
<0,7 µmol/L	11	78.6	3	21.4	14	10.08	0.002*	8.02	1.96 - 32.75
≥0.7 µmol/L	16	31.4	35	68.6	51				
Colostrum retinol									
<1.05 µmol/L	3	33.3	6	66.7	9	0.29	0.59	0.67	0.15 – 2.94
≥1.05 µmol/L	24	42.9	32	57.1	56				

χ^2 = Chi-squared test; OR = odds ratio; CI = Confidence interval; *Statistical significance: $p < 0.05$

Table 4- Retinol profile in maternal serum, newborn serum (umbilical cord) and colostrum, according to socio-demographic and obstetric characteristics of mothers and newborns attended in a public hospital in Santa Cruz, Brazilian Northeast (2012-2013).

[illegible]

Low weight	14	1.14	0.71		0.80	0.41		2.50	1.42-4.26	
Eutrophia	24	1.16	0.51	0.47 ^b	0.65	0.32	0.38 ^b	3.52	1.77-5.55	0.75 ^c
Overwheight	18	1.42	0.59		0.84	0.41		2.91	1.10-4.23	
Obesity	07	1.27	0.56		0.78	0.20		2.14	2.09-4.58	
Parity^{d,e}										
Primiparous	19	1.32	0.63	0.50 ^d	0.76	0.35	0.93 ^d	1.70	0.80-3.76	0.002 ^{e*}
Multiparous	46	1.21	0.56		0.77	0.36		3.49	2.23-6.35	
Birth Weight^{d,e}										
< 2,500g	02	1.06	0.09	0.18 ^d	0.78	0.28	1.00 ^d	2.23	0.58-5.21	0.48 ^e
≥ 2,500g	62	1.25	0.59		0.75	0.36		3.06	1.73-5.11	

^aOne Minimum Brazilian Wage = 243.14 US dollars; ^bANOVA; ^cKruskal-Wallis; ^dStudent t test; ^eMan-Whitney; *Statistical significance: p<0.05

5.2 ARTIGO II

Artigo original enviado para *Nutrition Research*:

Effect of maternal supplementation of vitamin A given at different intervals on breast milk levels of retinol

Danielle S. Bezerra^{a,*}, Kátia C. A. N. de Oliveira^b, Karoline Q. M. A. de Araújo^b, Monalisa S. M. de F. Medeiros^b, Flávia A. P. S. dos Santos^b, Karla D. da S. Ribeiro^{c,d}, Jeane F. P. Medeiros^d, Mayara S. R. Lima^d, Roberto Dimenstein^d, Mônica M. Osório^e

^a Department of Nutrition, School of Health Sciences of Trairi – Federal University of Rio Grande do Norte, Santa Cruz, Rio Grande do Norte, Brazil.

^b University Hospital Ana Bezerra – Federal University of Rio Grande do Norte, Santa Cruz, Rio Grande do Norte, Brazil.

^c Department of Nutrition – Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

^d Department of Biochemistry, Bioscience Centre – Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

^e Postgraduate Program in Nutrition – Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

***Correspondence:** Department of Nutrition, School of Health Sciences of Trairi – Federal University of Rio Grande do Norte, Santa Cruz, Rio Grande do Norte, Brazil. E-mail: daniellesbezerra@yahoo.com.br. Fax: +55 84 32912411.

Abbreviations

ANOVA, analysis of variance

DVA, vitamin A deficiency

GEE, generalized estimating equations

HIV, human immunodeficiency virus

HPLC, high performance liquid chromatography

IMC, body mass index

IVACG, International vitamin A consultative group

WHO, World Health Organization

RJ, Rio de Janeiro-Brazil

RN, Rio Grande do Norte-Brazil

SPSS, Statistical Package for Social Sciences

IU, international units

VA, vitamin A

Abstract

Vitamin A deficiency (VAD) is still considered a nutritional problem during pregnancy, lactation, and early childhood. This study aimed to assess the effect of different megadoses of vitamin A (VA) given to mothers postnatally on the breast milk levels of retinol. Women were distributed into four intervention groups and given a single 200,000 IU postnatal dosage of VA at time 0 h (G200 0H); a single 200,000 IU dosage of VA in week four (G200 4W); 200,000 IU of VA at time 0 h + 200,000 IU of VA 24 h after the first supplementation (G400 24H); and 200,000 IU of VA at time 0 h + 200,000 IU of VA one week after the first supplementation (G400 1W). Breast milk samples were collected postnatally over a 12-week period, at 0 h, 24 h, 1 week, 4 weeks, and 12 weeks. Retinol levels were determined by high-performance liquid chromatography. The Generalized Estimated Equation (GEE) assessed the different retinol levels. At baseline the retinol levels in breast milk of all four groups were similar ($p = 0.83$). At 24 h the groups G200(0H), G400(24H), and G400(1W) presented higher retinol levels than group G200(4W) ($p < 0.001$). At times 1 week, 4 weeks, and 12 weeks after delivery, the retinol levels of all groups were similar ($p > 0.05$). Maternal VA supplementation given postnatally increased retinol levels in the colostrum. However, 12 weeks after delivery different supplementation dosages or administration times did not result in added benefit to the levels of retinol in mature breast milk.

Keywords: vitamin A, dietary supplements, breast milk, high pressure liquid chromatography, longitudinal studies, postpartum.

1. Introduction

Vitamin A deficiency (VAD) is still considered a nutritional problem during pregnancy, lactation, and early childhood in many regions around the world, especially in developing countries [1].

Maternal vitamin A (VA) supplementation in areas of risk for VAD was launched as a public health strategy to improve the level of this nutrient in nursing mothers and consequently, to increase VA levels in breast milk [2]. In this sense, in 1997 the World Health Organization (WHO) recommended giving mothers 200,000 IU of VA orally immediately after delivery wherever VAD was considered a public health problem [3].

Once theoretical studies suggested that two dosages could provide a prolonged and safe benefit to the mother-child VA status, in 2002 the recommendation regarding maternal supplementation was updated by the International Vitamin A Consultative Group (IVACG) to two dosages of 200,000 IU, totaling 400,000 IU. The first dosage should be given immediately after delivery and the second, between 24h and 6-8 weeks after delivery, that is, during the safe, sterile postnatal period [4, 5, 6].

An interval greater than 24h between dosages would theoretically be more advantageous because it would ensure a higher retention of the second supplement [7]. The time of supplementation could be critical for breast milk VA levels since a second VA supplement given at an optimal time would hypothetically be better stored, helping to benefit the VA status of the mother-child dyad. However, no study has investigated whether the interval between dosages would affect the results. Studies so far were designed to assess the benefits of different supplementation protocols, and the expected efficacy of the second supplement has not been

confirmed [8, 9, 10]. Hence, it is still necessary to assess whether breast milk retinol levels can be increased by giving high VA dosages postnatally at different intervals [11].

Although the WHO no longer recommends giving VA to women after delivery as a public health intervention to prevent maternal and child morbidity and mortality and reinforces that women after delivery should have an appropriate intake of dietary VA from a healthy and balanced diet [11], some countries like Brazil opted to continue giving women supplemental VA before hospital discharge. Brazil considers that the puerperal women living in risk areas for VAD do not get adequate amounts of dietary vitamin A to prevent this nutritional insufficiency [12]. It is believed that in the short term, postnatal supplementation of mothers with inadequate VA intake remains a way to increase maternal and child (through breast milk) VA stores [13].

Bearing in mind the already suggested different maternal supplementation protocols and the existing gaps, the present study aimed to compare the effect of giving mothers postnatally 200,000 IU or 400,000 IU of VA at different intervals on the breast milk levels of retinol. The study participants were women seen at a public maternity hospital located in the Brazilian Northeast.

2. Material and methods

2.1. Study design and population

The present study is a longitudinal clinical trial of healthy women seen at a public maternity hospital that provides care to women from the municipality of Santa Cruz-Rio Grande

do Norte (RN)-Brazil and nearby cities. The municipality has an area of approximately 624.36 Km² and 38,142 inhabitants, living mostly in urban areas [14].

2.2. Sample size calculation

Sample size was calculated by the inferential method, using mean values and measuring the dispersion of breast milk retinol levels, considering that the standard deviation of retinol in breast milk would not exceed 0.43 $\mu\text{mol/L}$ (mean = 3.9 $\mu\text{mol/L}$) [15]. Consequently, 14 women per group would be necessary to detect a difference of 0.3 $\mu\text{mol/L}$ with a power of 80% and a confidence of 95%.

2.3. Participant recruitment

The patients were recruited for the study at hospital admission for delivery. The exclusion criteria were: women aged more than 40 years; women with diabetes, high blood pressure, neoplasms, heart disease, syphilis, human immunodeficiency virus (HIV) and other infectious diseases, gastrointestinal tract diseases, mental disorders, multiple or preterm (< 37 weeks) fetuses, cerebral palsy, metabolic disorders, palatal cleft, digestive tract malformations, and lung disease; and women who took VA supplements during pregnancy.

2.4. Groups and follow-up

From July 2012 to July 2014, immediately after delivery the volunteers were placed in one of the four study groups. In the next twelve weeks, the volunteers then met periodically with the research team. A 12-week follow-up time was chosen because the first three or four months of lactation seem to be the period of greatest breast milk nutrient variation. After this period nutrient levels seem quite stable until the involution of the mammary gland [16, 17]. Thus, this period would be enough to demonstrate increments of retinol in breast milk after supplementation with megadoses of VA.

According to the Supplementation Program of the Brazilian Ministry of Health, the VA tablet should be given postnatally to all women seen in public hospitals in the Brazilian Northeast, so ethics prevented the inclusion of a non-supplemented group. Therefore, four intervention groups were created and given different VA megadoses at different intervals. This strategy allowed us to compare between dosages of 200,000 IU and 400,000 IU (200,000 IU + 200,000 IU) and verify whether the different protocols would affect breast milk retinol levels in the first twelve weeks after delivery. The intervention groups were as follows:

- G200(0H) = Single VA supplementation: 200,000 IU given orally immediately after delivery;
- G200(4W) = Single VA supplementation: 200,000 IU given orally four weeks after delivery;
- G400(24H) = Double VA supplementation: 200,000 IU given orally immediately after delivery + 200,000 IU given orally 24 hours after the first supplement (total of 400,000 IU of VA).
- G400(1W) = Double VA supplementation: 200,000 IU given orally immediately after delivery + 200,000 IU given orally one week after the first supplement (total of 400,000 IU of VA).

Figure 1 shows the follow-up times and how the women were recruited and distributed into the groups.

2.5. Intervention and breast milk collection

The first breast milk sample (baseline) was collected before breakfast in the ward the morning after delivery. Breast milk was collected by manually expressing one breast at least two hours after the last nursing. Later, all mothers except those in the G200(4W) group were given orally one 200,000 IU tablet of VA.

Twenty-four hours after the first breast milk collection, a new sample was collected from all participants followed by the second oral administration of 200,000 IU of VA to the participants in the G400(24H) group, totaling 400,000 IU of retinol.

One week after delivery, the puerperal women returned to the hospital for infant examination, according to the postnatal follow-up schedule. At this time a new breast milk sample was collected from all participants who showed up followed by giving the second oral 200,000 IU VA supplement to the participants in the G400(1W) group, totaling 400,000 IU of retinol.

New breast milk samples were collected during scheduled hospital visits, confirmed by telephone four and twelve weeks after delivery. After milk collection in the fourth week, the women in G200(4W) were given their first and only 200,000 IU VA tablet. In the twelfth week after delivery, all participants returned to the hospital for the last milk collection. All breast milk samples were collected in a standardized fashion, following the procedures used in the baseline collection.

The VA tablets used by the study were the same as the ones used by the Supplementation Program of the Brazilian Ministry of Health (Farmanguinhos-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) [12]. Each tablet has 200,000 IU (60 mg) of retinyl palmitate + 40 mg of vitamin E. They were personally given to the mothers at the hospital (ward and/or outpatient clinic) by the research team.

The mothers were strongly encouraged to maintain exclusive breastfeeding. However, those who introduced other foods (water and/or tea) during the follow-up were treated like all other mothers during the follow-up and not excluded from the study.

2.6. Anthropometric parameters

Maternal weight and height collected at the last prenatal visit were taken from the mothers' follow-up card. The mothers' nutritional status was analyzed according to the body mass index (BMI)-for-gestational age proposed by Atalah et al. (1997) [18] and adopted by the Brazilian Ministry of Health [19].

The infants' weight and length were collected from their hospital records and analyzed according to their z-score by the software Anthro version 3 [20].

2.7. Other variables of interest

The following delivery-related information was collected from the patients' medical records to characterize the sample: parity, delivery route, and neonatal sex. The participants were also interviewed to collect the following sociodemographic data: maternal age, marital status,

residence location, number of individuals in the household, maternal education level, and family income.

2.8. Biochemical retinol assessment

The samples were placed in sterile polypropylene tubes wrapped in aluminum foil to protect the samples from light. The samples were then frozen to -20 °C and taken to the Laboratory of Food and Nutrition Biochemistry of the Federal University of Rio Grande do Norte, located in the city of Natal.

For retinol analysis the milk samples were extracted by adapting the method developed by Giulliano et al. (1992) [21] as described below.

After thawing the samples in water baths $\leq 37^{\circ}\text{C}$ under 60 rpm stirring, the samples were submitted to alkaline saponification with two sample volumes of 50% v/v potassium hydroxide (Vetec®) to hydrolyze the retinyl esters. One sample volume of 95% ethanol (Vetec®) was also added to the sample to denature the proteins. Next the samples were homogenized for one minute by a vortex mixer and submitted to a 45°C warm bath for two hours.

Two milliliters of the extraction reagent hexane (Merck®) were added to the samples, followed by one minute of vortex mixing and centrifugation at 1073 G for 10 minutes. The supernatant (hexane phase) was placed in another tube, where another 2 mL of hexane was added. This procedure was repeated three times.

A 37°C water bath was used for evaporating approximately 3 mL of the hexane phase in a nitrogen atmosphere, and the resulting extracts were diluted again in 1 mL of high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade methanol (Vetec®). After stirring the

samples in a vortex mixer for one minute, 20 μL aliquots were placed in a chromatographer (Shimadzu®) for retinol quantification.

The mobile phase used for the analysis was methanol at 100% in an isocratic system with a flow of 1 mL/min and 4.2-minute retention time. Absorbance was monitored at a wavelength of 325 nm. Retinol in the samples was identified and quantified by comparing the area under the chromatographic peak with retinol's standard area under the peak (Sigma®). The concentrations of the standards were confirmed by an extinction coefficient specific for retinol in absolute ethanol (ϵ 1%, 1 cm = 1,780 at 325 nm).

Retinol in breast milk is presented in $\mu\text{mol/L}$ and used for expressing the nutritional status of maternal VA [22]. Values $<1.05 \mu\text{mol/L}$ were considered as indicative of subclinical VAD in breast milk [23].

2.9. Statistical analyses

The data were treated by the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 20.0 and analyzed descriptively. Continuous variables were expressed as means and standard deviations and the categorical variables, as percentages (%). In order to investigate the similarities between the characteristics of the experimental groups, the inferential part used Pearson's chi-square test (χ^2) and one-way analysis of variance (one-way ANOVA) for comparing proportions and means, respectively. A generalized estimating equation (GEE) with linear link function, autoregressive working correlation matrix (AR-1), Wald test for testing hypothesis, and Bonferroni correction investigated the effects of the independent variables (maternal group, follow-up time, living location, family income, education level, and

anthropometric nutritional status) on breast milk retinol levels. The significance level was set at 5% to minimize type-I error.

2.10. Ethical aspects

The Human Research Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (protocol no. 476/10; CAAE-0471.0.172.172-10) and the Research Commission of the study maternity hospital where the samples were collected approved the study.

Since all women were given supplements within the scheduled postnatal care period of the maternity hospital, they were advised to return to the hospital should adverse events happen to them and/or their babies up to three days after supplementation. However, none of the women or infants experienced headaches, vomiting, fontanelle bulging, or any other adverse events typical of maternal or child poisoning with megadoses of VA.

3. Results

The study women had a mean age of 25.5 (4.9) years, lived in the urban areas (79%) of the municipality of Santa Cruz-RN-Brazil, were married or living with their partners (86.4%), had incomplete elementary or high school (65.3%), and had a monthly family income equal to or below one Brazilian minimum salary (61.7%). At the end of pregnancy, 42.4% of the participants had normal gestational BMI. Their mean parity was 1.0 (1.2) and most achieved vaginal delivery (75%) (Table 1).

The mean gestational age of the neonates was 37.3 weeks, most were males (54.8%), and most had normal nutritional status (96.4%) according to the weight-for-age (W/A) ratio (Table 1). Twelve weeks after delivery, 95.2% of the infants were still being exclusively breastfed; only 4 infants had been introduced to water and/or tea (G200 0H: n = 2; G400 24H: n = 1; G400 1W: n = 1) (data not shown).

The characteristics of the women in the four experimental groups are similar ($p > 0.05$) (Table 1).

The predictive model showed that the follow-up time and the interaction group-follow-up time had a significant impact on breast milk retinol levels ($p < 0.001$) (Table 2).

Table 3 shows the mean retinol levels in the breast milk of the four treatment groups at the various follow-up times. The Bonferroni post hoc correction identified changes in the breast milk levels of retinol in the different treatment groups ($p < 0.05$) (Table 3).

All groups had similar baseline levels of breast milk retinol ($p = 0.83$). However, retinol level in the colostrum at 24h was lower in the G200(4W) group than in the G200(0H) ($p = 0.007$); G400(24H) ($p = 0.001$); and G400(1W) ($p = 0.006$) groups, which remained similar ($p = 1.00$) at 24h. At 1 week, 4 weeks, and 12 weeks all groups had similar breast milk retinol levels ($p > 0.05$) (Figure 2).

4. Discussion

The present study used breast milk to assess the nutritional status of VA since breast milk can show the effectiveness of VA-related interventions and help to monitor VA status [22, 23]. Moreover, breast milk is not affected by systemic inflammation [24].

Assessment of the effect of different VA supplementation protocols on the levels of breast milk retinol showed that all four groups had similar levels at baseline, 1 week, 4 weeks, and 12 weeks after delivery. Hence, although other studies have not assessed the ideal interval for maternal supplementation, the present results are similar to other published results: retinol levels in different body fluids do not differ after maternal supplementation with megadoses of VA [8, 9, 10].

The apparent absence of a demonstrable effect from the different supplementation protocols on breast milk retinol levels does not necessarily mean that postnatal maternal VA supplementation is not beneficial. The most important question is whether the use of megadoses of VA would be enough to meet the infant's basic requirements [25] and to create hepatic stores for the critical breastfeeding period. The mean breast milk retinol levels at different assessment times showed that all groups were above the cut-off point for VAD in breast milk ($1.05 \mu\text{mol/L}$) [23] (Table 3).

However, one week after delivery only the groups G400(24H) and G400(1W) had adequate breast milk retinol levels to create VA stores in the infant's liver ($\geq 2.3 \mu\text{mol/L}$) [22]. At weeks four and twelve, all groups had inadequate breast milk vitamin A to create hepatic stores. This is concerning because children under two years of age depend mostly on breast milk to get VA and create the hepatic VA stores they need after weaning [22]. Thus, the study infants are at risk of VAD because, already in the exclusive breastfeeding period, they cannot obtain enough retinol to create hepatic stores.

The groups that received at least one megadose of VA immediately after delivery [G200(0H), G400(24H), G400(1W)] had significantly higher levels of colostrum VA at 24h than at baseline ($p < 0.05$). This increase was not seen in the group G200(4W) ($p > 0.05$) since the

participants in this group only received the supplement four weeks after delivery. Hence, one can suggest that supplementation immediately after delivery is quantitatively more advantageous than supplementation at four weeks because the naturally high levels of colostrum retinol [26] increased in the groups G200(0H), G400(24H), and G400(1W), maximizing and anticipating the benefit to the maternal and child nutritional status.

Additionally, maternal supplementation with 200,000 IU of VA immediately after delivery may also increase the colostrum levels of immunoglobulin A (IgA) [27]. This factor is promising with respect to the potential benefits to the infant's health and survival and reinforces the importance of feeding the newborn with maternal colostrum [28]. IgA levels, like VA levels, tend to decrease as the milk matures [26, 29]. Therefore, these facts make the period immediately after birth a key time for maternal supplementation with megadoses of vitamin A, considering the improvements in the nutritional status and immunity of mothers and infants.

Since lactation stage (colostrum, transition milk, and mature milk) impacts VA level in breast milk [26], it would be important to find a supplementation regime capable of keeping retinol levels high as much as twelve weeks after delivery. However, comparison of the treatment protocols showed that even mothers given the supplement four weeks after delivery [G200(4W)] did not have higher breast milk retinol levels than the other groups in week twelve. Yet, retinol levels in weeks one, four, and twelve were higher than the cut-off point for VAD ($1.05 \mu\text{mol/L}$) and similar in all groups ($p > 0.05$), which is certainly favorable for the nutritional status of mothers and infants. Moreover, the eight-week interval between the last two measurements (weeks 4 and 12) may have been too big to detect differences in the retinol levels of group G200(4W) and the other groups.

The group who received two supplements with a 24-hour interval [G400(24H)] had higher retinol levels than the other groups at week one, but the difference was not significant ($p > 0.05$). Retinol levels in week one could have increased due to the second supplementation 24h after delivery, but this was not enough to cause significant differences between the groups. Thus, the G400(24H) protocol could have affected the natural decreasing trend of retinol in breast milk, making the retinol levels of transitional milk closer to the baseline levels. However, this similarity was not seen in weeks four and twelve after delivery ($p < 0.05$).

The use of a double supplementation protocol for the short-term prevention of VAD in populations at risk would be logistically more viable than one supplement given four weeks after delivery [G200(4W)] or the double supplementation with a one-week interval [G400(1W)]. The smaller interval [G400(24H)] would allow the women to receive the two supplements at the hospital, so a second visit would not be required for a first [G200(4W)] or second [G400(1W)] dosage. These last two protocols would require the mothers to return to the hospital or home visits by the health care team, which sometimes is not possible because of great distances and/or difficult access.

However, the G400(24H) protocol was statistically similar to the G200(0H) protocol in all occasions, and numerically inferior in weeks four and twelve after delivery. These protocols also presented the additional disadvantage of increasing health care costs, which could prevent their selection. This is important because in economically disadvantaged populations such as those in the Brazilian Northeast, all efforts and resources should be carefully provided and directed towards the set of strategies capable of increasing the mother's and infant's VA status and the health and life conditions of the general population.

In conclusion, VA supplements given to mothers from the Brazilian Northeast immediately after birth, regardless of dosage, increased colostrum VA levels significantly 24 hours after administration. However, twelve weeks after delivery the different supplementation protocols did not promote differences in breast milk retinol levels. After comparing the retinol levels promoted by the different treatments in the various study occasions, we believe the protocol adopted by the Brazilian Vitamin A Supplementation Program in areas of risk for VAD, that is, a single 200,000 IU megadose of VA given immediately after delivery, is reasonable.

However, these data should be interpreted with caution since the present study was conducted in a maternity hospital located in a poor municipality of the Brazilian Northeast, limiting extrapolation of the results to groups with better socioeconomic status and different characteristics that could influence the results. We also recommend that other studies measure breast milk retinol levels at shorter intervals to determine exactly how long each treatment increases retinol levels in breast milk.

Other considerations are also key to fighting VAD since maternal supplementation is a prophylactic and emergent measure. Hence, simultaneous interventions that fight the causes of VAD in each population are necessary to reduce the long-term costs and increase the long-term sustainability of all efforts more than continuous VA supplementation. This will certainly improve more consistently and decisively the VA status, general health, and quality of life of the mother-child dyad.

Conflito de interesses: None.

Acknowledgements: The authors cordially thank University Hospital Ana Bezerra (HUAB-UFRN) for having allowed this study to be done, to all the women and their newborns who

participated in the study on a voluntary basis, and to all those involved in collecting the samples and in the biochemical analyses of the biological samples, as well as to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) of Brazil for their financial support. However, the funder institution has had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

References

- [1] World Health Organization (WHO). Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005: WHO global database on vitamin A deficiency. Geneva, World Health Organization, 2009.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598019_eng.pdf
- [2] Pan American Health Organization (PAHO). Providing vitamin A supplements through immunization and other health contacts for children 6-59 months and women up to 6 weeks postpartum. A Guide for Health Workers. 2. ed, 2001.
- [3] WHO, UNICEF, IVACG Task Force. Vitamin A supplements: a guide to their use in the treatment and prevention of vitamin A deficiency and xerophthalmia. 2.ed. Geneva, 1997.
<http://whqlibdoc.who.int/publications/1998/924354506X.pdf?ua=1&ua=1>.
- [4] Allen LH, Haskell M. Vitamin A requirements of infants under six months of age. In: De Benoist B, Martines J, Goodman T, Editors. Special Issue on Vitamin A Supplementation and the Control of Vitamin A Deficiency. Food Nutr Bull 2001;22:214–34.
<http://archive.unu.edu/unupress/food/fnb22-3.pdf>

- [5] Bahl R, Bhandari N, Wahed MA, Kumar GT, Bhan MK, WHO/CHD Immunization-Linked Vitamin A Group. Vitamin A supplementation of women postpartum and of their infants at immunization alters breast milk retinol and infant vitamin A status. *J Nutr* 2002;132:3243-48,. <http://jn.nutrition.org/content/132/11/3243.long>
- [6] International Vitamin A Consultative Group (IVACG). Os Acordos de Annecy para Avaliação e Controlo da Deficiência de Vitamina A: Sumário das Recomendações e Clarificações. Washington, USA, 2002. http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/Pnacu409.pdf
- [7] Benoist B, Martines J, Goodman T. Vitamin A supplementation and the control of vitamin A deficiency: Conclusions. *Food Nutr Bull* 2001;22(3):335-40. <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/FNBvol22N3sep01.pdf>
- [8] Darboe MK, Thurnham DI, Morgan G, Adegbola RA, Secka O, Solon JA, et al. Effectiveness of an early supplementation scheme of high-dose vitamin A versus standard WHO protocol in Gambian mothers and infants: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369(9579):2088-96. <http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736%2807%2960981-7.pdf>
- [9] Bezerra DS, Araújo KF, Azevêdo GMM, Dimenstein R. A Randomized Trial Evaluating the Effect of 2 Regimens of Maternal Vitamin A Supplementation on Breast Milk Retinol Levels. *J Hum Lact* 2010;26(2):148-56. <http://jhl.sagepub.com/content/26/2/148.long>
- [10] dos Santos CS, Kruze I, Fernandes T, Andreto LM, Figueiroa JN, Diniz AS. The Effect of a Maternal Double Megadose of Vitamin A Supplement on Serum Levels of Retinol in Children Aged under Six Months. *Journal of Nutrition and Metabolism*. Vol. 2013, Article ID 876308,2013, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/876308>.

- [11] World Health Organization (WHO). Guideline: Vitamin A supplementation in postpartum women. Geneva: World Health Organization, 2011.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501774_eng.pdf. Access: 28/02/2012.
- [12] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual de condutas gerais do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_condutas_suplementacao_vitamina_a.pdf
- [13] Christian P. Commentary: postpartum vitamin A supplementation and infant mortality. *Int J Epidemiol* 2010;39(5):1227-8.
<http://ije.oxfordjournals.org/content/39/5/1227.full.pdf+html>
- [14] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística / *Brazilian Institute of Geography and Statistics* (IBGE), 2014.
<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=241120>
- [15] Dimenstein R, Dantas JCdeO, Medeiros ACP, Cunha LRdeF. Influência da idade gestacional e da paridade sobre a concentração de retinol no colostro humano. *ALAN* 2010;60(3):235-9. <http://www.scielo.org/ve/pdf/alan/v60n3/art04.pdf>
- [16] Garza C, Johnson CA, Smith EOB, Nichols BL. Changes in the nutrient composition of human milk during gradual weaning. *Am J Clin Nutr* 1983; 37:61–5.
<http://ajcn.nutrition.org/content/37/1/61.long>
- [17] Goldman AS, Garza C, Goldblum RM. Immunologic components in human milk during the second year of lactation. *Acta Paediatr Scand* 1983;72:461–2.

- [18] Atalah E, Castillo C, Castro R, Aldea A. Propuesta de um nuevo estandar de evaluación nutricional em embarazadas / Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women. Rev Med Chile 1997;125(12):1429-36.
- [19] Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância alimentar e nutricional - Sisvan: orientações básicas para a coleta, processamento, análise de dados e informação em serviços de saúde / [Andhressa Araújo Fagundes, Denise Cavalcante de Barros, Helen Altoé Duar, Luciana Monteiro Vasconcelos Sardinha, Mariana Martins Pereira, Marília Mendonça Leão]. – Brasília: Ministério da Saúde, 2004.
- http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/orientacoes_basicas_sisvan.pdf
- [20] World Health Organization (WHO). Anthro para computadoras personales, versión 3, 2009: Software para evaluar el crecimiento y desarrollo de los niños del mundo. Ginebra, OMS 2009. (<http://www.OMS.int/childgrowth/software/en/>).
- [21] Giuliano AR, Neilson EM, Kelly BE, Canfield LM. Simultaneous Quantitation and Separation of Carotenoids and Retinol in Human Milk by High-Performance Liquid Chromatography. Method Enzymol 1992;213:391-9.
- [22] Stoltzfus RJ, Underwood BA. Breast-milk vitamin A as an indicator of the vitamin A status of women and infants. Bull World Health Organ 1995;73:703-11.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2486808/pdf/bullwho00409-0137.pdf>
- [23] World Health Organization (WHO). Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluation intervention programmes. Geneva: WHO,1996.
- http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/vitamin_a_deficiency/WHO_NUT_96.10/en/index.html

- [24] Dunchek B, Nussenblatt B, Ricks MO, Kumwenda N, Neville MC, Moncrief DT et al. Breast milk retinol concentrations are not associated with systemic inflammation among breast-feeding women in Malawi. *J Nutr* 2005;135:223–6.
<http://jn.nutrition.org/content/135/2/223.full.pdf+html>
- [25] Caminha MFC, Batista Filho M, Fernandes TF dos S, Arruda IKG de, Diniz AS. Suplementação com vitamina A no puerpério: revisão sistemática / Vitamin A supplementation during puerperium: systematic review. *Rev Saúde Pública* 2009;43(4):699-706. http://www.scielo.br/pdf/rsp/v43n4/en_318.pdf
- [26] Macias C, Schweigert FJ. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alphatocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann Nutr Metab* 2001;45(2):82–5. <http://www.karger.com/Article/Pdf/46711>
- [27] Lima MS, Ribeiro PP, Medeiros JM, Silva IF, Medeiros AC, Dimenstein R. Influence of postpartum supplementation with vitamin A on the levels of immunoglobulin A in human colostrum. *J Pediatr (Rio J)* 2012;88:115-8.
<http://www.scielo.br/pdf/jped/v88n2/a03v88n2.pdf>
- [28] de Pee S. Benefits of postpartum vitamin A supplementation. *J Pediatr (Rio J)* 2012;88(2):99-100.
- [29] Araújo ED, Gonçalves AK, Cornetta MdaC, Cunha H, Cardoso ML, Morais SS, et al. Evaluation of the Secretory Immunoglobulin A Levels in the Colostrum and Milk of Mothers of Term and Pre-Term Newborns. *Braz J Infect Dis* 2005;9(5):357-62.
<http://www.scielo.br/pdf/bjid/v9n5/a02v09n5.pdf>

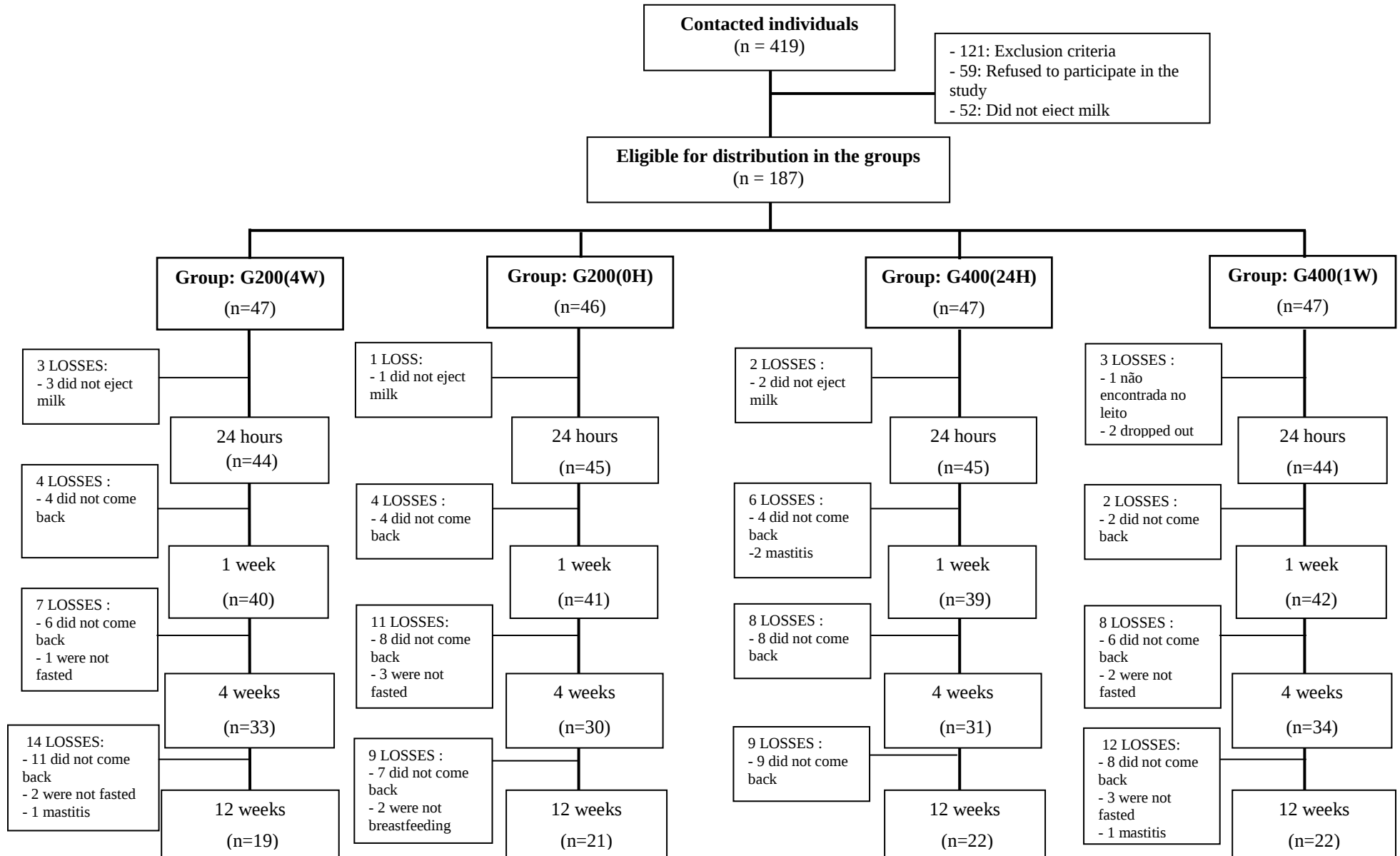


Figure 1 – Participant recruitment, distribution, and follow-up flowchart.

Table 1- Characteristics of the study women and infants, Santa Cruz-RN-Brazil (2012-2014).

VARIABLES	G200 (0H) (n = 21)	G200 (4W) (n = 19)	G400 (24H) (n = 22)	G400 (1W) (n = 22)	p	Total (n = 84)
MATERNAL						
Age (years)	24.6 (3.9) ^a	26.8 (5.6) ^a	24.0 (4.5) ^a	26.7(5.1) ^a	0.15 ^c	25.5 (4.9)
Parity	1.1 (1.7) ^a	0.9 (1.1) ^a	0.9 (0.8) ^a	1.3 (1.1) ^a	0.66 ^c	1.0 (1.2)
Marital status					0.84 ^d	
<i>Single</i>	4 (4.9) ^b	2 (25) ^b	3 (3.7) ^b	2 (2.5) ^b		11 (13.6)
<i>Married</i>	17 (21.0) ^b	16 (19.8) ^b	19 (23.5) ^b	18 (22.2) ^b		70 (86.4)
People per household					0.47 ^d	
<i>Up to three</i>	14 (17.6) ^b	11 (13.8) ^b	13 (16.3) ^b	13 (16.4) ^b		51 (64.1)
<i>Four or more</i>	7 (8.8) ^b	7 (8.8) ^b	8 (10) ^b	7 (8.8) ^b		29 (36.3)
Education level					0.48 ^d	
<i>High school and higher education</i>	6 (7.4) ^b	5 (6.1) ^b	8 (9.9) ^b	9 (11.0) ^b		28 (34.6)
<i>Up to elementary school</i>	15 (18.5) ^b	13 (16.1) ^b	14 (17.3) ^b	11 (13.6) ^b		53 (65.3)
Family income (minimum salaries)					0.98 ^d	
≤ 1	13 (16.0) ^b	11 (13.6) ^b	12 (14.8) ^b	14 (17.3) ^b		50 (61.7)
>1	8 (9.9) ^b	7 (8.7) ^b	10 (12.3) ^b	6 (7.4) ^b		31 (38.3)
Residence location					0.57 ^d	
<i>Rural</i>	5 (6.2) ^b	3 (3.7) ^b	3 (3.7) ^b	6 (7.4) ^b		17 (21.0)
<i>Urban</i>	16 (19.8) ^b	15 (18.5) ^b	19 (23.5) ^b	14 (17.3) ^b		64 (79.0)
Gestational nutritional status					0.57 ^d	
<i>Low weight</i>	5 (6.3) ^b	2 (2.5) ^b	5 (6.3) ^b	1 (1.3) ^b		13 (16.3)
<i>Normal weight</i>	9 (11.3) ^b	7 (8.8) ^b	6 (7.5) ^b	12 (15.0) ^b		34 (42.4)

<i>Overweight</i>	6 (7.5) ^b	6 (7.5) ^b	6 (7.5) ^b	5 (6.3) ^b		23 (28.8)
<i>Obese</i>	1 (1.3) ^b	2 (2.5) ^b	4 (5.0) ^b	3 (3.8) ^b		10 (12.5)
Delivery route					0.44 ^d	
<i>Vaginal</i>	16 (19.0) ^b	12 (14.3) ^b	17 (20.2) ^b	19 (22.6) ^b		64 (76.2)
<i>Caesarian</i>	5 (6.0) ^b	7 (8.3) ^b	5 (6.0) ^b	3 (3.6) ^b		20 (23.8)
INFANTS						
Gestational age (weeks)	39.8 (1.1) ^a	39.8 (1.2) ^a	40.1 (1.2) ^a	38.8 (1.4) ^a	0.89 ^c	37.3 (2.3)
Sex					0.05 ^d	
<i>Female</i>	8 (9.5) ^b	14 (16.7) ^b	8 (9.5) ^b	8 (9.5) ^b		38 (45.2)
<i>Male</i>	13 (15.5) ^b	5 (6.0) ^b	14 (16.7) ^b	14 (16.7) ^b		46 (54.8)
Weight (kg)	3357.9 (368.3) ^a	3430.3 (454.6) ^a	3283.6 (435.4) ^a	3410.7 (301.9) ^a	0.62 ^c	3368.6 (389.6)
Length (cm)	49.0 (1.5) ^a	49.3 (1.8) ^a	48.2 (1.7) ^a	49.0 (1.6) ^a	0.24 ^c	48.9 (1.7)
Weight-for-age (W/A)					0.35 ^d	
<i>Low weight-for-age</i>	0 (0) ^b	1 (1.2) ^b	2 (2.4) ^b	0 (0) ^b		3 (3.6)
<i>Adequate weight-for-age</i>	21 (25) ^b	18 (21.4) ^b	20 (23.8) ^b	22 (26.2) ^b		81 (96.4)

Brazilian minimum salary = 243.14 United States dollars; a = mean (standard deviation); b = n (%); c = ANOVA; d = χ^2 . Statistical significance for p<0.05.

Table 2 - Predictive model for the concentration of retinol after intervention and control of maternal variables.

Source	Model		
	χ^2 de Wald	df	P
Group	3.20	3	0.36
Follow-up time	92.71	4	<0.001*
Group*follow-up time	65.53	12	<0.001*
Living location	0.50	1	0.47
Family income	1.35	1	0.24
Education level	1.30	1	0.25
Anthropometric nutritional status	1.70	3	0.63

df: degrees of freedom

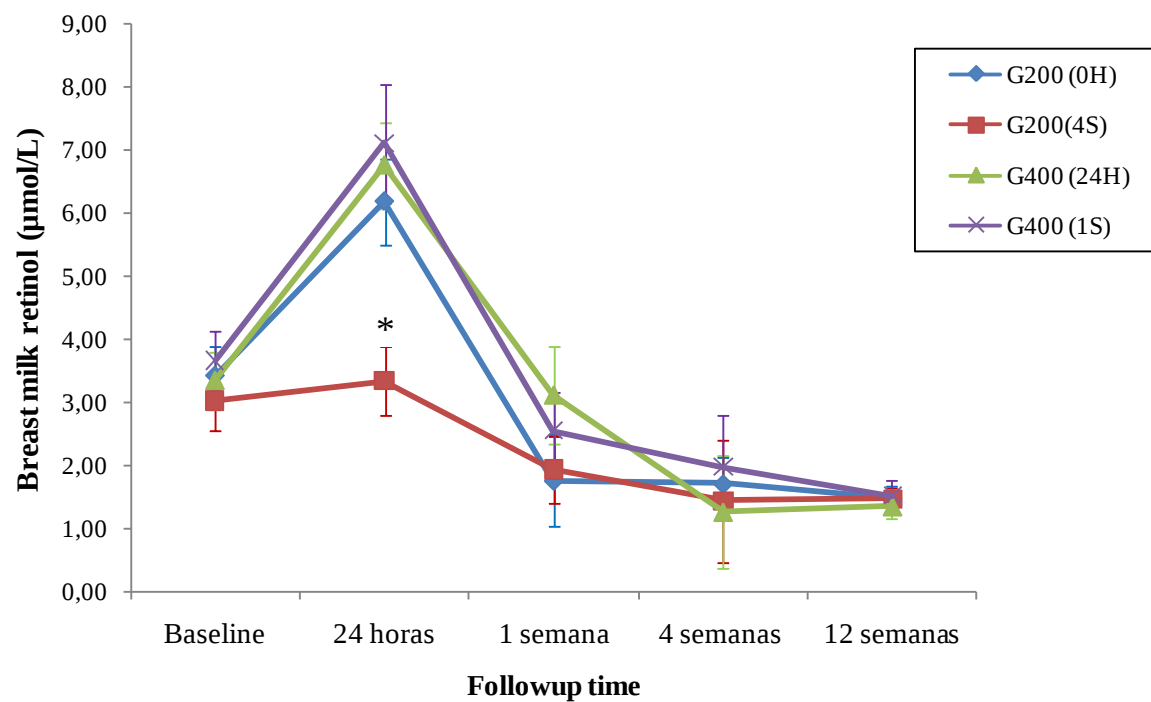
Dependent variable: retinol

Model: group, follow-up time, group*follow-up time, living location, family income, education level, anthropometric nutritional status.

Table 3 – Intragroup assessment of the mean retinol levels in breast milk ($\mu\text{mol/L}$) in different follow-up times, Santa Cruz-RN-Brazil (2012-2014).

Follow-up	Groups			
	G200(0H)	G200(4W)	G400(24H)	G400(1W)
Baseline (IC95%)	3.43 (2.50-4.36) ^a	3.03 (2.09-3.97) ^d	3.35 (2.44-4.25) ^f	3.66 (2.72-4.60) ⁱ
24 hours (IC95%)	6.19 (4.89-7.50) ^b	3.34 (2.20-4.47) ^d	6.76 (5.38-8.14) ^g	7.11 (5.18-9.05) ^j
1 week (IC95%)	1.76 (1.04-2.29) ^c	1.93 (1.24-2.61) ^{d,e}	3.12 (1.87-4.37) ^f	2.54 (1.87-3.20) ^{i,l}
4 weeks (IC95%)	1.71 (1.15-2.28) ^c	1.44 (1.01-1.88) ^e	1.26 (0.89-1.63) ^h	1.97 (1.53-2.41) ^l
12 weeks (IC95%)	1.48 (1.11-1.85) ^c	1.46 (1.09-1.82) ^e	1.35 (0.96-1.74) ^h	1.51 (1.02-2.01) ^l

95%CI = 95% confidence interval. Different lower case letters in the columns = mean intragroup retinol levels differ between the different occasions. Bonferroni post hoc correction with statistical significance for $p < 0.05$.



*Bonferroni post hoc correction with statistical significance for $p < 0.05$.

Figure 2 – Intergroup assessment of breast milk retinol levels by follow-up time, Santa Cruz-RN-Brazil (2012-2014).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo ao investigar o estado nutricional de VA de uma população materno-infantil do município Santa Cruz-RN, ratificou que a DVA ainda faz parte do contexto de sociedades socioeconomicamente desprivilegiadas como as localizadas no Nordeste do Brasil. Sabe-se que populações como esta sofrem com a concomitante existência de agravos, o que nos leva a acreditar que a DVA é apenas mais um dentre os vários indicadores de má-qualidade de vida existente na população alvo. Isso justifica ações abrangentes e integradas que busquem benefícios, os quais devem contemplar melhor distribuição de renda, adequado acesso à alimentação, saneamento básico, assistência em saúde, educação, segurança e lazer. Além disso, as estratégias governamentais devem ser planejadas para a obtenção de resultados favoráveis à sua população em curto, médio e longo prazo.

De modo profilático direcionado, fazem-se oportunos todos os esforços voltados a melhorias do estado nutricional de gestantes e nutrízes, visando também o benefício conjunto para seus respectivos filhos, uma vez que estes apresentam importante relação de dependência com o *status* materno. Isso implica na urgente necessidade de avaliação e reavaliação das estratégias já existentes, de modo a confirmar ou refutar os benefícios aspirados com tais ações.

Nessa proposta, embora não tenham sido encontradas diferenças estatísticas quanto às concentrações de retinol no leite materno maduro entre os tratamentos investigados pelo presente estudo, considera-se a continuação da suplementação materna com megadose única de VA (200.000 UI) no pós-parto imediato, adotada pelo Programa de Suplementação de vitamina A no Brasil, uma das estratégias emergenciais adequadas ao combate e controle da DVA em áreas de risco no país. Este protocolo proporciona a antecipação do incremento das concentrações de retinol no colostro, em comparação à administração realizada no pós-parto mais tardio (4ª semana). A administração única de 200.000 UI de VA durante o pós-parto imediato também é vantajosa por impactar em menores custos quando comparado à dose dupla (200.000 UI + 200.000 UI) e, também, por proporcionar maior viabilidade logística, quando comparado à administração de dose única (200.000 UI) realizada somente 1 semana

pós-parto ou em comparação à dose dupla (200.000 UI + 200.000 UI) quando administrada com intervalo de 1 semana entre a 1ª e a 2ª administração.

Ainda se destaca que outras pesquisas semelhantes a esta devem ser encorajadas e desenvolvidas em outras populações, no intuito de contribuir para uma melhor compreensão sobre a complexidade do metabolismo da VA em lactantes e, assim, auxiliar no conhecimento do tema, uma vez que este é fundamental para a adequada tomada de decisões.

REFERÊNCIAS

ALLEN, L. H.; HASKELL, M. Vitamin A requirements of infants under six months of age. Special Issue on Vitamin A Supplementation and the Control of Vitamin A Deficiency. **Food Nutrition Bulletin**, 22, p. 214-234, 2001.

ALLEN, L. H.; HASKELL, M. Estimating the Potencial for Vitamin A Toxicity in Women and Young Children. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. S2907- S2919, 2002.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. de; PENTEADO, M. V. C. Vitamina A. In: PENTEADO, M.D.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri, SP: Manole, cap. 2, p. 52-74, 2003.

ATALAH, E. et al. Propuesta de um nuevo estandar de evaluación nutricional em embarazadas / Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women. **Revista médica de Chile**, v. 125, n. 12, p.1429-36, 1997.

AZAIS-BRAESCO, V.; PASCAL, G. Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 5, p. 1325S-1333S, 2000.

BAHL, R. et al. Immunization-Linked Vitamin A Group. Vitamin A supplementation of women postpartum and of their infants at immunization alters breast milk retinol and infant vitamin A status. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 3243-48, 2002.

BENDER, D. A. The vitamins (Chapter 8). In: GIBNEY, M. J.; LANHAM-NEW, S. A.; CASSIDY, A.; VORSTER, H. H., Editors. **The Nutrition Society Textbook Series: Introduction to human nutrition**. 2 ed. Oxford. Wiley-Blackwell, p. 132-187, 2009. ISBN 978-1-4051-6807-6.

BENOIST, B.; MARTINES, J.; GOODMAN, T. Vitamin A supplementation and the control of vitamin A deficiency: Conclusions. **Food and Nutrition Bulletin**, vol. 22, n. 3, 2001.

BEZERRA, D. S. et al. A Randomized Trial Evaluating the Effect of 2 Regimens of Maternal Vitamin A Supplementation on Breast Milk Retinol Levels. **Journal of Human Lactation**, v. 26, n. 2, p.148-56, 2010.

BIESALSKI, H. K.; GRIMM, P. **Nutrição: texto e atlas**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

BLOMHOFF, R.; BLOMHOFF, H. K. Overview of Retinoid Metabolism and Function. **Journal of Neurobiology**, v. 66, p. 606–30, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vitamina A Mais: Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A: Condutas Gerais**. Ministério da Saúde: Brasília, DF, 2004.

BRASIL. **Portaria no 729, de 13 de maio de 2005**. Institui o Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A. Disponível em: http://dtr2004.saude.gov.br/nutricao/documentos/vita/portaria_729_vita.pdf. Acesso em: 17 maio 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro Brasileiro de Análise e Planejamento. **Pesquisa nacional de demografia e saúde da criança e da mulher (PNDS-2006): dimensões do processo reprodutivo e da saúde da criança**. Centro Brasileiro de Análise e Planejamento: Brasília, DF, 2009. http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnds_crianca_mulher.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília, DF, 2011. http://189.28.128.100/nutricao/docs/geral/orientacoes_coleta_analise_dados_antropometricos.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual de condutas gerais do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília, DF, 2013.

CHRISTIAN, P. Commentary: postpartum vitamin A supplementation and infant mortality. **International Journal of Epidemiology**, v. 39, p. 1227-8, 2010.

COMBS Jr, G. F. **The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health** (Fourth Edition), 4 ed. Elsevier Academic Press, 2012. 400p.

DARBOE, M. K. et al. Effectiveness of an early supplementation scheme of high-dose vitamin A versus standard WHO protocol in Gambian mothers and infants: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 369, n. 9579, p.2088-96, 2007.

DIMENSTEIN, R. et al. Influência da idade gestacional e da paridade sobre a concentração de retinol no colostro humano. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 60, n. 3, p. 235-9.

FERNANDES, T. F. dos S. et al. Effect on Infant Illness of Maternal Supplementation With 400 000 IU Vs 200 000 IU of Vitamin A. **Pediatrics**, v. 129, n. 4, p. 960-6, 2012.

FERNANDES, T. F. dos S. et al. Serum Retinol Concentrations in Mothers and Newborns at Delivery in a Public Maternity Hospital in Recife, Northeast Brazil. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 32, n. 1, p.28-35, 2014.

FAO/WHO expert consultation on human vitamin and mineral requirements. Vitamin A. In: **Human Vitamin and Mineral Requirements**. Report of a joint FAO/WHO expert consultation Bangkok, Thailand, 2001. Cap 7. p. 87-102.

FRASER P. D; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 228–65, 2004.

GIULIANO, A. R. et al. Simultaneous Quantitation and Separation of Carotenoids and Retinol in Human Milk by High-Performance Liquid Chromatography. **Methods in Enzymology**, v. 213, p. 391-399, 1992.

GODEL, J. C. et al. Perinatal vitamin A (retinol) status of northern Canadian mothers and their infants. **Biology of the Neonate**, v. 69, p. 133–9, 1996.

GOGIA, S.; SACHDEV, H. S. Vitamin A supplementation for the prevention of morbidity and mortality in infants six months of age or less (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews** 2011, Issue 10. Art. No.: CD007480. DOI: 10.1002/14651858.CD007480.pub2.

JAMISON, D. Keynote Address: Vitamin A in a Global Context. In: HARVEY, P. W. J.; TAYLOR, T. M. (Rapporteurs); DARY, O (Collaborator). **Improving the vitamin A status**

of populations. Report of the XXI International Vitamin A Consultative Group Meeting. Marrakech, Morocco, February 2003. ISBN 1-57881-166-X.

HAIDER, B. A.; BHUTTA, Z. A. Neonatal vitamin A supplementation for the prevention of mortality and morbidity in term neonates in developing countries. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, sous presse, CD006980 (http://www2.cochrane.org/reviews/en/protocol_3D5983EE82E26AA201CA3F309C5CC271.html).

HASKELL, M. J.; BROWN, K. H. Maternal Vitamin A Nutriture and the Vitamin A Content of Human Milk. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 4, n. 3, 1999.

HUMPHREY, J. H.; ICHORD, R. N. Safety of vitamin A supplementation of postpartum women and young children. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 22, n. 3, p. 311-19, 2001.

IDINDILI, B. et al. Randomized controlled safety and efficacy trial of 2 vitamin A supplementation schedules in Tanzanian infants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 5, p. 1312-9, 2007.

IMDAD, A. et al. Impact of vitamin A supplementation on infant and childhood mortality. **BMC Public Health**, 11(Suppl 3): S20, 2011.

INTERNATIONAL VITAMIN A CONSULTATIVE GROUP (IVACG). **Os Acordos de Annecy para Avaliação e Controlo da Deficiência de Vitamina A: Sumário das Recomendações e Clarificações.** USA, Washington, Agosto 2002.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary references intake for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc.** Washington (DC): Nacional Academy Press, 2001. 800 p.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements** / Washington (DC): Nacional Academy Press, 2006. p. 170-181.

KIRKWOOD, B. et al. Neonatal vitamin A supplementation and infant survival. Correspondence 1643, **The Lancet**, v. 376, 2010.

LEVIN, M. S. Vitamin A: absorption, metabolism, and deficiency. In: JOHNSON, L., Editor. **Encyclopedia of Gastroenterology**. 1 ed. Washington University, St. Louis, Missouri and St. Louis VA Medical Center. Elsevier (USA), 2004, p. 616–18.

MACIAS, C.; SCHWEIGERT, F. J. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alphanol and total lipids in human milk throughout early lactation. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 45, p. 82–85, 2001.

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

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 11º ed., Rocca, São Paulo, 2005.1242 p.

McLAREN, D.S.; FRIGG, M. **Manual de ver y vivir sobre los trastornos por deficiencia de vitamina A (VADD)**. Washington: Organization Panamericana de la Salud, 1999.

McLAREN, D. S.; KRAEMER, K. (eds): **Manual on Vitamin A Deficiency Disorders (VADD)**. World Rev Nutr Diet. Basel, Karger, 2012, v. 103, p 7–17 (DOI:10.1159/000258434).

MARTINS, M. C. et al. Panorama das ações de controle da deficiência de vitamina A no Brasil. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 5-18., 2007.

MILLER, M. et al. Why Do Children Become Vitamin A Deficient? **Journal of Nutrition**, v. 132, 2867S–2880S, 2002.

NETTO, M. P.; PRIORE, S. E.; FRANCESCHINI, S. C. C. Indicators of the nutritional state of vitamin A. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição = Journal of the Brazilian Society for Food and Nutrition**, São Paulo, SP, v. 31, n. 1, p. 127-150, abr. 2006.

OMS. Diretriz: **Suplementação de vitamina A em mulheres no pós-parto**. Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2013a.

OMS. Diretriz: **Suplementação de vitamina A em bebês e crianças de 6-59 meses de vida**. Genebra, Organização Mundial da Saúde, 2013b.

OMS. Diretriz: **Suplementação neonatal de vitamina A**. Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2013c.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Providing vitamin A supplements through immunization and other health contacts for children 6-59 months and women up to 6 weeks postpartum**. A Guide for Health Workers. 2 ed, 2001.

PENTEADO, M. V. C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. São Paulo. Manole, 2003. 612p.

REDDY, V. Dietary Approaches: Choosing Your Food. In: HARVEY, P. W. J.; TAYLOR, T. M. (Rapporteurs); DARY, O (Collaborator). **Improving the vitamin A status of populations**. Report of the XXI International Vitamin A Consultative Group Meeting. Marrakech, Morocco, February 2003. ISBN 1-57881-166-X.

RICE, A. L. et al. Maternal Vitamin A or β -carotene Supplementation in Lactating Bangladeshi Women Benefits Mothers and Infants but Does Not Prevent Subclinical Deficiency. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 2, p. 356-65, 1999.

RICE, A. L.; WEST, K. P. Jr., BLACK, R. E. **Vitamin A deficiency. Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors**. Vol. 1. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2004.

ROSS, D. A. Recommendations for vitamin A supplementation. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 2902S–2906S, 2002. (Suppl.)

ROSS, A. C. Metabolism of vitamin A in early life. In: WHO. **Report: WHO technical consultation on vitamin A in newborn health: mechanistic studies**. Geneva: WHO, 2012.

ROSS, A. C. **Vitamin A: Physiology, Dietary sources, and requirements**. Encyclopedia of Human Nutrition. Elsevier Ltd, v. 4, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00273-7>.

SANTOS, C. S. dos et al. The effect of a maternal double megadose of vitamin A supplement on serum levels of retinol in children aged under six months. **Journal of Nutrition and Metabolism**. vol. 2013, Article ID 876308, 2013, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/876308>.

SOLOMONS, N.W.A. Vitamin A and carotenoids. In: BOWMAN, B.A.; RUSSEL, R. M. **Present knowledge in nutrition**. 8. ed. Washington: ILSI press, cap. 12, p. 127-145, 2001.

SOLOMONS, N. W. A. Vitamin A. In: ERDMAN Jr JW, MACDONALD IA, ZEISEL SH. **Present knowledge in nutrition**. 10. ed. Washington: ILSI press, cap. 11, p. 149-184, 2012.

SOMMER, A.; DAVIDSON, F. R. Assessment and control of vitamin A deficiency: the Annecy Accords. **Journal of Nutrition**, v. 32, p. S2845-2850, 2002.

STOLTZFUS, R. J; UNDERWOOD, B. A. Breast-milk vitamin A as an indicator of the vitamin A status of women and infants. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 73, p. 703-11, 1995.

TANUMIHARDJO, S. H. Assessing Vitamin A Status: Past, Present and Future. **Journal of Nutrition**, v.134, n.1, p.290S - 293S, 2004.

TANUMIHARDJO, S. A. Biomarkers of vitamin A status: what do they mean? In: WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report: Priorities in the assessment of vitamin A and iron status in populations**. Panama City, Panama, 15–17 September 2010. Geneva, WHO, 2012.

TCHUM, S. K. et al. Evaluation of vitamin A supplementation regimens in Ghanaian postpartum mothers with the use of the modified-relative-dose-response test. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 2, p. 1344-9, 2006.

UNDERWOOD, B. A. Maternal vitamin A status and its importance in infancy and early childhood. **American Journal of Clinical Nutrition**, 1994;59: 517S-522S.

WEST, K. P. Jr. Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age. **Journal of Nutrition**, v.132, 9 Suppl, p.2857S–2866S, 2002.

WEST, K. P. Jr. Vitamin A: Deficiency and Interventions. In: CABALLERO, B. (editor). **Encyclopedia of Human Nutrition**. 3 ed, 2013. p. 323-332. ISBN: 978-0-12-384885-7

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application for monitoring and evaluating interventions programmes: Micronutrient Series.** Geneva: WHO/UNICEF, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). UNICEF, IVACG Task Force. **Vitamin A supplements: a guide to their use in the treatment and prevention of vitamin A deficiency and xerophthalmia.** 2.ed. Geneva, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Vitamina A na gestação e lactação.** Centro Colaborador de Alimentação e Nutrição do Nordeste I. Recomendações e relatório de uma consultoria. Recife, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005: WHO global database on vitamin A deficiency.** Geneva, WHO, 2009a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Anthro para computadoras personales,** versión 3, 2009: Software para evaluar el crecimiento y desarrollo de los niños del mundo. Ginebra, OMS, 2009b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guideline: Vitamin A supplementation in postpartum women.** Geneva: WHO, 2011.

APÊNDICE A – Informações obstétricas e amostras biológicas

Dados pessoais		
Q1. Nome:		
Q2. Endereço:		
Q3. Telefone:		
Q4. Data de Nascimento:	Q5. Idade:	
Dados da consulta (Pré-natal/CARTÃO DA GESTANTE)		
Q6. D.U.M.		
Q7. Paridade (número de filhos, contar com a/o gestação/nascimento atual):		
Q8. Altura:	Q9. Peso:	
Q10. Data da última pesagem:	Q11. IG:	
Q12. Estado Nutricional Materno:	1.Baixo peso 2.Normal 3.Sobrepeso	
Q13. Usou medicamento ou vitamina?	4.Sim Qual: _____ 5.Não	
Q14. Amamentou durante a gestação?	4.Sim Frequência: _____ 5.Não	
EXAME	VALOR	DATA
Hemoglobina		
Hematócrito		
Dados sobre o parto (PRONTUÁRIO)		
Q16. Data/parto:	Q17. Hora/parto:	
Q18. Tipo/parto:	Q 18.1 Sexo do RN:	
Q19. Peso do RN:	Q19.1. Perímetro cefálico (PC):	
Q19.2. Perímetro Torácico (PT):	Q19.3. Perímetro Braquial (PB):	
Q20. IG/ RN:		
Q21. Aleitamento no pós-parto:	4.Sim 5.Não	
Q22. Mãe foi suplementada com vit. A (antes da coleta leite 0h)?	4.Sim Dia/Hora: 5.Não	
EXAME	VALOR	DATA
Hemoglobina		
Hematócrito		
Coleta da amostra		
Q23. SANGUE materno:	1ª coleta (venoso 0h) Data: _____ Hora: _____ 2ª coleta (venoso 3meses) Data: _____ Hora: _____	
Q23.1. SANGUE do bebê:	1ª coleta (cordão umbilical) Data: _____ Hora: _____ 2ª coleta (venoso - 3meses) Data: _____ Hora: _____	
Q24. Coleta de LEITE:	1ª coleta (Leite 0h) Data: _____ Hora: _____ 2ª coleta (Leite 24h) Data: _____ Hora: _____ 3ª coleta (Leite 1 sem.) Data: _____ Hora: _____ 4ª coleta (Leite 1 mês) Data: _____ Hora: _____ 5ª coleta (Leite 3 meses) Data: _____ Hora: _____	
Q25. Suplementação (Vit. A/ 200.000 UI)	1ª Data: _____ Hora: _____ 2ª Data: _____ Hora: _____	

AGENDAMENTO DO RETORNO	
1 semana - Data:_____	Hora:_____
1 mês - Data:_____	Hora:_____
3 meses - Data:_____	Hora:_____

Data: ____/____/____

Responsável:_____

APÊNDICE B – Informações Sócio-econômicas

1. Qual a sua idade? _____
2. Como você se considera:
(A) Branca.
(B) Parda.
(C) Preta.
(D) Amarela.
(E) Indígena.
3. Qual a sua religião?
(A) Católica.
(B) Protestante ou Evangélica.
(C) Espírita.
(D) Umbanda ou Candomblé.
(E) Outra.
(F) Sem religião.
4. Qual seu estado civil?
(A) Solteira.
(B) Casada/ mora com um companheiro.
(C) Separada / divorciada / desquitada.
(D) Viúva.
5. Onde e como você mora atualmente?
(A) Em casa ou apartamento, com minha família.
(B) Em casa ou apartamento, sozinha.
(C) Em quarto ou cômodo alugado, sozinha.
(D) Em habitação coletiva: hotel, hospedaria, quartel, pensionato, república etc.
(E) Outra situação.
6. Como e onde é sua casa? SIM OU NÃO
(A) Própria.
(B) É em rua calçada ou asfaltada.
(C) Tem água corrente na torneira.
(D) Tem eletricidade.
(E) É situada em zona rural.
(F) É situada em comunidade indígena.
(G) É situada em comunidade quilombola.
7. Quantos(as) filhos(as) você tem? (*Contando com o RN*) _____
8. Quem mora com você? (Marque uma resposta para cada item.)
(A) Pai e/ou mãe
(B) Esposo(a) / companheiro(a)
(C) Filhos(as)
(D) Irmãos(ãs)
(E) Outros parentes, amigos(as) ou colegas
(F) Outra situação

9. Quantas pessoas moram em sua casa? *(Contando com seus filhos, pais, irmãos ou outras pessoas que moram em uma mesma casa).*

10. Qual a sua escolaridade?

- (A) Analfabeto.
- (B) Semi-analfabeto.
- (C) Alfabetizado.
- (D) Ensino fundamental incompleto.
- (E) Ensino fundamental completo.
- (F) Segundo grau incompleto.
- (G) Segundo grau completo.
- (H) Terceiro grau completo.
- (I) Terceiro grau completo.

11. Você trabalha, atualmente? SIM () NÃO ()

12. Se você está trabalhando atualmente, qual a sua atividade? _____

13. Se você está trabalhando atualmente, qual a sua renda ou seu salário mensal? _____

14. Somando a sua renda com a renda das pessoas que moram com você, quanto é, aproximadamente, a renda familiar? *(Considere a renda de todos que moram na sua casa.)*

APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da Pesquisa: *Impacto da suplementação materna com dupla megadose de vitamina A, administrada em diferentes intervalos, sobre a composição do leite materno e o estado nutricional do binômio mãe-filho nos primeiros meses pós-parto.*

Justificativa: As mães que estão amamentando podem ficar deficientes em uma vitamina chamada de vitamina A. Ela é fundamental a saúde da mãe e também ao crescimento e desenvolvimento normal de seu bebê, que muitas vezes, adquire esta vitamina apenas do leite materno. Uma vez que a mãe esteja deficiente nesta vitamina, seu leite também poderá estar. Pensando nisso, o Ministério da Saúde criou um projeto para fornecer às mães que amamentam, altas quantidades da vitamina A: a suplementação. Porém não se sabe se a quantidade da de suplementação e o momento em que ela é dada, aumenta o teor de retinol no leite materno, independente do estado nutricional de vitamina A da mãe. A falta de informações sobre a suplementação contribui para a realização deste trabalho.

Objetivo: Avaliar a influência da suplementação materna de vitamina A, sobre os níveis de retinol no leite materno e sangue do binômio mãe-filho.

Pesquisador responsável: Profa. Danielle Soares Bezerra (Endereço: Rua Industrial João Motta, 1637, Capim Macio, Natal-RN, tel.: 9131-3806).

Comitê de Ética – UFPE: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 | Fone PABX: (81) 2126.8000.

Este formulário que você deverá assinar foi elaborado de acordo com a Resolução CNS 196-96, que orienta procedimentos referentes às pesquisas que requer experiências com humanos. Nesta pesquisa, a senhora será submetida aos procedimentos enumerados a seguir:

1. Endereço residencial
2. Dados sobre a consulta pré-natal (Data da última menstruação, paridade, uso de medicamentos ou vitaminas, exames realizados: hemograma e parasitológico de fezes, altura e peso)
3. Dados sobre o parto (data, horário, tipo de parto, peso e idade gestacional do recém nascido)
4. Coleta de material biológico (25 mL de leite materno (fracionado em 5 coletas) e 3 coletas de 05 mL de sangue)
5. Coleta de placenta

Para seu esclarecimento informamos que:

1. Este estudo pode oferecer riscos aos participantes como dor de cabeça, tontura, fraqueza, enjôo, vômitos; onde o acompanhamento e assistência serão realizados pela equipe da instituição (Hospital Universitário Ana Bezerra). Entretanto, trará benefícios quanto ao conhecimento de efeitos da suplementação com vitamina A nos níveis deste nutriente no leite de lactantes do grupo populacional estudado, bem como possíveis efeitos no crescimento do recém-nascido;
2. Serão garantidos esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia;

3. Os sujeitos poderão se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, por quaisquer motivos sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado;
4. Os resultados obtidos em análise serão arquivados e mantidos eticamente em absoluto sigilo;
5. Declaramos que não há previsão de ressarcimento para os sujeitos que participarem da pesquisa, uma vez que os mesmos não terão gastos financeiros com a pesquisa. Entretanto, caso ocorra algum eventual dano ao participante, decorrente da pesquisa, a instituição (UFPE) o indenizará.

Santa Cruz, ____ de ____ de 20____

Assinatura da Participante

Assinatura do Pesquisador

ANEXO A - Comprovante de submissão do artigo I ao *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*.

29/01/2015

Imprimir

Assunto:	A manuscript number has been assigned to Vitamin A deficiency and associated factors in the mother-newborn pairs
De:	JPGN (em@editorialmanager.com)
Para:	daniellesbezerra@yahoo.com.br;
Data:	Segunda-feira, 22 de Dezembro de 2014 18:26

Dec 22, 2014

Dear Dr. Bezerra,

Your submission entitled "Vitamin A deficiency and associated factors in the mother-newborn pairs" has been assigned the following manuscript number: JPGN-14-905.

You may check on the progress of your submission at any time by logging in to Editorial Manager as an author.

Thank you for submitting to the Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition.

Regards,

Emily Senerth
Managing Editor (NA)
Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition
<http://jpgn.edmgr.com/>

Your username is: DANIELLEBEZERRA
Your password is: bezerra387

ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo II ao *Nutrition Research*

29/01/2015

Imprimir

Assunto:	Submission Confirmation
De:	Nutrition Research (ees.nr.0.2eccc0.o4a315bc@eesmail.elsevier.com)
Para:	daniellesbezerra@yahoo.com.br;
Data:	Quinta-feira, 29 de Janeiro de 2015 2:09

Dear Prof. Danielle Bezerra,

Your submission entitled "Effect of maternal supplementation of vitamin A given at different intervals on breast milk levels of retinol" has been received by Nutrition Research

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/nr/>.

Your username is: daniellesbezerra@yahoo.com.br

If you need to retrieve password details please go to: http://ees.elsevier.com/nr/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Nutrition Research

ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 030/2011 - CEP/CCS

Recife, 03 de fevereiro de 2011

Registro do SISNEP FR – 393077

CAAE – 0471.0.172.172-10

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 476/10

Título: **Impacto da suplementação materna com dupla megadose de vitamina A, administrada em diferentes intervalos, sobre a composição do leite materno e estado nutricional do binômio mãe-filho.**

Pesquisador Responsável: Danielle Soares Bezerra.

Senhor (a) Pesquisador (a):

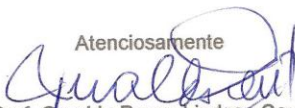
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 02 de fevereiro de 2011.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

A
Doutoranda Danielle Soares Bezerra
Programa de Pós- Graduação em Nutrição- CCS/UFPE