



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

MAYARA SANTA ROSA LIMA

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE VITAMINA A MATERNA
E DE NEONATOS PREMATUROS E A TERMO**

NATAL
2015

MAYARA SANTA ROSA LIMA

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE VITAMINA A MATERNA
E DE NEONATOS PREMATUROS E A TERMO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Dimenstein

**NATAL
2015**

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de
Biociências

Lima, Mayara Santa Rosa.

Avaliação da concentração de vitamina A materna e de neonatos prematuros e a termo / Mayara Santa Rosa Lima. – Natal, RN, 2015.

77 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Dimenstein.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Vitamina A. – Dissertação. 2. Cordão umbilical. – Dissertação. 3. Leite humano. – Dissertação. I. Dimenstein, Roberto. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 577.161.1

MAYARA SANTA ROSA LIMA

Avaliação da concentração de vitamina A materna e de neonatos prematuros e a termo.

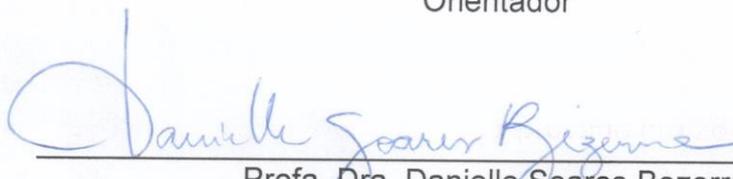
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em 26 de maio de 2015.

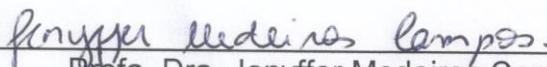
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Roberto Dimenstein
Departamento de Bioquímica – UFRN
Orientador



Profa. Dra. Danielle Soares Bezerra
Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi - UFRN
Examinadora Externa ao Programa



Profa. Dra. Jenyffer Medeiros Campos
Departamento de Engenharia Química-DEQ - UFPE.
Examinadora Externa à Instituição

Dedico esta obra à minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me direcionar de acordo com a vontade dEle, dando-me a segurança de que fiz a escolha certa ao optar por seguir este caminho;

Aos meus pais Laércio e Marlene e irmãos Milena e Matheus, por terem me apoiado em mais esta escolha, pela compreensão e amor, mesmo na minha ausência;

A toda a minha família, especialmente minha tia Maria de Jesus, minha prima Alessandra e seu esposo Erivan, que me acolheram como filha por mais esses anos de curso;

Às amigas de infância e adolescência, especialmente Evelyne Rodrigues, Genilsa Duarte, Rafaela Martins e Annelly Chagas, pelos momentos de descontração que me fizeram sair da rotina em meio a tantos afazeres e pelo apoio em todos os momentos;

A Evelylyn Câmara e Ednilson Dias, pela amizade e presença constante, pelas palavras de sabedoria e fé que tantas vezes me confortaram;

Ao professor Roberto Dimenstein, meu orientador durante seis anos, que teve papel fundamental no direcionamento da minha vida acadêmica;

Às amigas Karla Danielly e Jeane Pires, por todo o companheirismo e auxílio durante o mestrado e por serem tão competentes e dedicadas ao nosso projeto;

Às “prematuquinhas”, que foram companheiras, amigas e parte fundamental da pesquisa que realizamos: Alyne Batista, Amanda Braga, Amanda Cibely, Amanda Rebouças, Anna Larissa, Dalila Fernandes, Luana Patrícia, Luana Queiroz, Paula Bellot, Raquel Dantas e Talita Raquel; e todas as demais ICs que auxiliaram nas coletas;

Às “labAmigas” Cristiane Gurgel, Gabrielle Mahara, Heleni Aires, Juliana Dametto, Keith Hellen e Larissa Lira, exemplos de profissionais e amigas, por todo o apoio;

A toda a equipe de pesquisa da FACISA que foi responsável pelas coletas em Santa Cruz e a todos que compõem a família LABAN, essencial para o andamento dos projetos e que torna os dias no laboratório mais alegres;

Aos companheiros de turma do mestrado, por toda a cooperação durante as disciplinas, deixando-as mais fáceis e leves;

Aos amigos da graduação, que sempre me disseram que esse era o meu destino; especialmente a Priscila Fabíola, grande amiga que a Nutrição me trouxe, e a Miriam Livramento, mesmo que o Atlântico nos separe;

Aos professores Daniel Lanza, Danielle Soares, Héryka Ramalho, Renata Neves, Jenyffer Campos e Felipe Nalon, pelas contribuições e disponibilidade para melhorar este trabalho;

Ao DBq, em especial aos professores da pós-graduação, por todo o conhecimento compartilhado; e aos funcionários Ângela, Jonas e Sr. Márcio (*in memoriam*), pelo auxílio diário no departamento;

A todas as mulheres que se dispuseram a participar desta pesquisa juntamente com os seus bebês, durante um momento único e delicado de suas vidas;

Aos profissionais que fazem parte da Maternidade Escola Januário Cicco e do Hospital Universitário Ana Bezerra, principalmente às equipes das salas de parto, à técnica Renicleide, à nutricionista residente Cibelle Iaskara e aos setores de Nutrição e de Ensino e Pesquisa.

A todos, muito obrigada!

*“O homem nasceu para aprender, aprender
tanto quanto a vida lhe permita.”*

Guimarães Rosa

RESUMO

A vitamina A é um nutriente essencial em diversos processos fisiológicos, como crescimento e desenvolvimento, de modo que um adequado estado nutricional nesse nutriente é fundamental na gestação e lactação. Mulheres lactantes e crianças em aleitamento materno são consideradas grupos de risco para a deficiência de vitamina A e alguns fatores podem aumentar o risco de hipovitaminose, como a prematuridade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração de vitamina A em lactantes e recém-nascidos pré-termo e a termo, por meio da determinação do retinol no soro materno, no soro do cordão umbilical e no leite materno coletado até 72 horas pós-parto. Foram recrutadas 182 parturientes, divididas em grupo pré-termo (GPT; n=118) e grupo termo (GT; n=64). No grupo pré-termo também foram analisadas amostras de leite de transição (7^o-15^o dia; n=68) e leite maduro (30^o-55^o dia; n=46). O retinol foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A concentração materna de retinol sérico foi 48,6 ± 12,3 µg/dL no GPT e 42,8 ± 16,3 µg/dL no GT (p<0,01). O retinol no soro do cordão umbilical foi 20,4 ± 7,4 µg/dL no GPT e 23,2 ± 7,6 µg/dL no GT (p>0,05). Entre os recém-nascidos, 43% dos prematuros e 36% dos a termo apresentaram baixos níveis de retinol sérico no cordão umbilical (<20 µg/dL). No colostro, lactantes pré-termo e termo apresentaram média de retinol de 100,8 ± 49,0 µg/dL e 127,5 ± 65,1 µg/dL, respectivamente (p<0,05). A média de retinol no leite pré-termo aumentou para 112,5 ± 49,7 µg/dL na fase de transição e reduziu para 57,2 ± 23,4 µg/dL no leite maduro, diferindo significativamente entre todas as fases (p<0,05). Ao comparar com a recomendação de ingestão de vitamina A (400 µg/dia) o leite colostro do GT atingiu a recomendação para lactentes, porém no GPT a recomendação não foi atingida em nenhuma das fases. As mães de recém-nascidos prematuros possuíam concentração sérica de retinol superior à de mães a termo, entretanto, isso não foi refletido no retinol do soro do cordão umbilical, uma vez que os prematuros apresentaram menor concentração da vitamina. Tal condição pode ser explicada devido à menor hemodiluição fisiológica materna e transferência placentária de retinol para o feto durante a gestação pré-termo. A comparação do retinol no colostro evidenciou menor concentração no GPT, no entanto na fase de transição houve um aumento importante do conteúdo de retinol liberado pela glândula mamária de lactantes pré-termo. Essa situação evidencia uma adaptação fisiológica própria da prematuridade, provavelmente no sentido de contribuir mais para a formação das reservas hepáticas de retinol dos lactentes prematuros.

Palavras-chave: Vitamina A; Retinol; Soro; Cordão umbilical; Leite humano; Prematuro.

ABSTRACT

Vitamin A is an essential nutrient for many physiological processes such as growth and development, so that their adequate nutritional state is essential during pregnancy and lactation. Lactating women and children in breastfeeding are considered risk groups for vitamin A deficiency and some factors may increase the risk of vitamin A deficiency, such as prematurity. The aim of this work was to evaluate the vitamin A concentration in preterm and term lactating women and newborns by determination of retinol in maternal serum, umbilical cord serum and breast milk collected until 72 hours postpartum. 182 mothers were recruited and divided into preterm group (GPT; n = 118) and term group (GT, n = 64). In preterm group were also analyzed transition milk (7th-15th day; n = 68) and mature milk (30th-55th day; n = 46) samples. Retinol was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Maternal retinol concentration in serum was 48.6 ± 12.3 $\mu\text{g/dL}$ in GPT and 42.8 ± 16.3 $\mu\text{g/dL}$ in the GT ($p < 0.01$). Cord serum retinol was 20.4 ± 7.4 $\mu\text{g/dL}$ in GPT and 23.2 ± 7.6 $\mu\text{g/dL}$ in GT ($p > 0.05$). Among newborns, 43% of premature and 36% of term had low levels of serum retinol in umbilical cord (< 20 $\mu\text{g/dL}$). In colostrum, the retinol in preterm and term groups had an average of 100.8 ± 49.0 $\mu\text{g/dL}$ and 127.5 ± 65.1 $\mu\text{g/dL}$, respectively ($p < 0.05$). The retinol average in preterm milk increased to 112.5 ± 49.7 $\mu\text{g/dL}$ in transition phase and decreased to 57.2 ± 23.4 $\mu\text{g/dL}$ in mature milk, differing significantly in all stages ($p < 0.05$). When comparing with the recommendation of vitamin A intake (400 $\mu\text{g/day}$) GT colostrum reached the recommendation for infants, but in GPT the recommendation was not achieved at any stage. Mothers of premature infants had higher serum retinol than mothers at term; however, this was not reflected in serum retinol of umbilical cord, since premature had lower concentration of retinol. Such condition can be explained due to lower maternal physiological hemodilution and placental transfer of retinol to the fetus during preterm gestation. Comparison of retinol in colostrum showed lower concentrations in GPT; however the transition phase there was a significant increase of retinol content released by the mammary gland of preterm mothers. This situation highlights a specific physiological adaptation of prematurity, likely to more contribute to formation of hepatic reserves of retinol in premature infants.

Keywords: Vitamin A; Retinol; Serum; Umbilical cord; Milk, human; Infant, premature.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura química de compostos com atividade biológica de vitamina A..... | 15 |
| Figura 2 - Estrutura química de alguns carotenoides..... | 16 |
| Figura 3 - Absorção, metabolismo e transporte do retinol no organismo..... | 18 |
| Figura 4 - Mecanismo de ação do ácido retinoico..... | 21 |
| Figura 5 - Esquema da transferência de retinol para a glândula mamária..... | 26 |
| Figura 6 - Número estimado de nascimentos pré-termo no mundo em 2010..... | 28 |
| Figura 7 - Fluxograma de coleta de amostras biológicas dos grupos termo e pré-termo..... | 36 |
| Figura 8 - Esquema da extração de retinol das amostras de leite materno..... | 38 |
| Figura 9 - Esquema da extração de retinol das amostras de soro materno e do cordão umbilical..... | 39 |
| Figura 10 - Perfil cromatográfico do retinol em CLAE, com tempo de retenção de 5,0 minutos. (A) Pico do padrão de referência para retinol. (B) Pico de eluição de retinol em uma amostra de soro materno. (C) Pico de eluição de retinol em uma amostra de leite materno..... | 41 |
| Figura 11 - Curva de calibração e equação da reta obtida através da aplicação em CLAE de diferentes concentrações do padrão de retinol..... | 42 |
| Figura 12 - Concentração de retinol ($\mu\text{g}/\text{dL}$) no leite colostro de parturientes a termo e pré-termo..... | 48 |
| Figura 13 - Concentração de retinol ($\mu\text{g}/\text{dL}$) nos leites colostro (n=106), de transição (n=68) e maduro (n=46) de parturientes pré-termo..... | 49 |
| Figura 14 - Fornecimento de retinol ($\mu\text{g}/\text{dia}$) pelos leites colostro (n=106), de transição (n=68) e maduro (n=46) de parturientes pré-termo e comparação à recomendação de vitamina A para lactentes, segundo o <i>Institute of Medicine</i> (2001)..... | 50 |
| Figura 15 - Diagramas de dispersão mostrando as correlações entre os níveis de retinol no soro materno e do cordão umbilical ($\mu\text{g}/\text{dL}$) dos grupos termo, n=64 (A) e pré-termo, n=32 (B)..... | 51 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Características de parturientes a termo e pré-termo atendidas em duas maternidades públicas do Rio Grande do Norte, Brasil, 2014..... | 45 |
| Tabela 2 - Características de recém-nascidos a termo e pré-termo nascidos em duas maternidades públicas do Rio Grande do Norte, Brasil, 2014..... | 47 |
| Tabela 3 - Concentração de retinol ($\mu\text{g/dL}$) no soro do cordão umbilical e soro materno dos grupos a termo e pré-termo..... | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| ADH | Álcool desidrogenase |
| AI | Ingestão adequada |
| ANOVA | Análise de variância |
| AR | Ácido retinoico |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| cm | Centímetro(s) |
| CMRE | Quilomícrons remanescentes |
| CRBP II | Proteína ligadora de retinol celular tipo II |
| CYP26 | Citocromo P450RAI |
| dL | Decilitro(s) |
| DP | Desvio-padrão |
| Dpp | Dia(s) pós-parto |
| DVA | Deficiência de vitamina A |
| ER | Éster de retinil |
| g | Gramas(s) |
| GPT | Grupo pré-termo |
| GT | Grupo termo |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| HUAB | Hospital Universitário Ana Bezerra |
| Ig | Idade gestacional |
| IOM | <i>Institute of Medicine</i> |
| kDa | Quilodalton(s) |
| KOH | Hidróxido de potássio |
| L | Litro(s) |
| LABAN | Laboratório de Alimentos e Bioquímica da Nutrição |
| LPL | Lipoproteína lipase |
| LRAT | Lecitina retinol aciltransferase |
| M | Médio |
| MEJC | Maternidade Escola Januário Cicco |
| mg | Miligrama(s) |

| | |
|------------------------|---|
| µg | Micrograma(s) |
| mL | Mililitro(s) |
| µmol | Micromol(s) |
| n | Número amostral |
| ng | Nanograma(s) |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| P | Pequeno |
| QM | Quilomícron |
| RAL | Retinal |
| Raldh | Retinal desidrogenase |
| RAR | Receptor nuclear de ácido retinoico |
| RAREs | Elementos de resposta ao ácido retinoico |
| RBP | Proteína ligadora de retinol |
| RDA | <i>Recommended Dietary Allowance</i> |
| RDH | Retinol desidrogenase |
| RN | Rio Grande do Norte |
| RNA_m | RNA (<i>ribonucleic acid</i>) mensageiro |
| ROL | Retinol |
| RXR | Receptor X retinoide |
| Stra6 | Gene homólogo estimulado pelo ácido retinoico 6 |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TG | Triglicerídeo |
| TTR | Transtirretina |
| UFRN | Universidade Federal do Rio Grande do Norte |
| UNICEF | Fundo das Nações Unidas para a Infância |
| EUA | Estados Unidos |
| UTI | Unidade de Terapia Intensiva |
| VA | Vitamina A |
| v/v | volume/volume |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |
| °C | Graus Celsius |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1. VITAMINA A | 14 |
| 1.1.1. História | 14 |
| 1.1.2. Estrutura química e fontes | 14 |
| 1.1.3. Absorção, transporte e metabolismo | 16 |
| 1.1.4. Funções e papel no desenvolvimento embrionário | 20 |
| 1.1.5. Recomendações dietéticas | 22 |
| 1.2. DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A | 23 |
| 1.3. ALEITAMENTO MATERNO E VITAMINA A | 24 |
| 1.4. PREMATURIDADE E VITAMINA A | 27 |
| 2. OBJETIVOS | 31 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 31 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 31 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 3.1. MATERIAL DE LABORATÓRIO | 32 |
| 3.2. CARACTERIZAÇÃO E ÉTICA DO ESTUDO | 33 |
| 3.3. CÁLCULO AMOSTRAL | 33 |
| 3.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO | 34 |
| 3.5. COLETA DE DADOS E PREPARO DAS AMOSTRAS | 34 |
| 3.6. ANÁLISE DO RETINOL | 37 |
| 3.6.1. Extração de retinol do leite | 37 |
| 3.6.2. Extração de retinol do soro | 39 |
| 3.6.3. Condições cromatográficas | 40 |
| 3.6.4. Linearidade, precisão e exatidão do método | 42 |
| 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 43 |
| 3.8. VALORES DE REFERÊNCIA | 43 |
| 4. RESULTADOS | 45 |
| 5. DISCUSSÃO | 52 |
| 6. CONCLUSÕES | 58 |
| REFERÊNCIAS | 59 |
| APÊNDICES | 70 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. VITAMINA A

1.1.1. História

A vitamina A foi descoberta no início dos anos 1900 por Davis e McCollum na Universidade de Wisconsin e simultaneamente por Osborne e Mendel em Yale, nos Estados Unidos. Estes grupos estavam estudando os efeitos de dietas com proteínas purificadas e fontes de carboidratos, como caseína e farinha de arroz, no crescimento e sobrevivência de ratos jovens. Foi observado que o crescimento cessou e os animais morreram, exceto quando a dieta era suplementada com manteiga, óleo de peixe, ou com uma fração solúvel em éter dessas substâncias ou de leite, ovos ou carnes. Deduziu-se que uma substância desconhecida era essencial para o crescimento e desenvolvimento normais desses animais, sendo esta inicialmente chamada de “lipossolúvel A” (MCCOLLUM; DAVIS, 1913; OSBORNE et al., 1913).

Pouco tempo depois, foi descoberto que os carotenos amarelos presentes em extratos de plantas tinham propriedades similares àquela, podendo ser convertidos na forma bioativa lipossolúvel através do metabolismo em tecidos animais (ROSS; HARISSON, 2007).

1.1.2. Estrutura química e fontes

O termo vitamina A refere-se a compostos lipossolúveis que possuem atividade biológica de retinol, incluindo o retinol, o retinal e o ácido retinoico. Emprega-se, ainda, o termo retinoide, que inclui todos os compostos naturais com atividade biológica de vitamina A, inclusive alguns que não são intimamente relacionados com o retinol; e análogos sintéticos dessa molécula, com ou sem atividade biológica (BLOMHOFF; BLOMHOFF, 2006).

Essa família de moléculas possui uma estrutura com vinte carbonos composta por um anel ciclohexenil (anel β -ionona) e uma cadeia lateral isoprenóide, cuja

substituição no 15º carbono caracteriza quimicamente as diferentes substâncias com atividade de vitamina A (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001) (Figura 1).

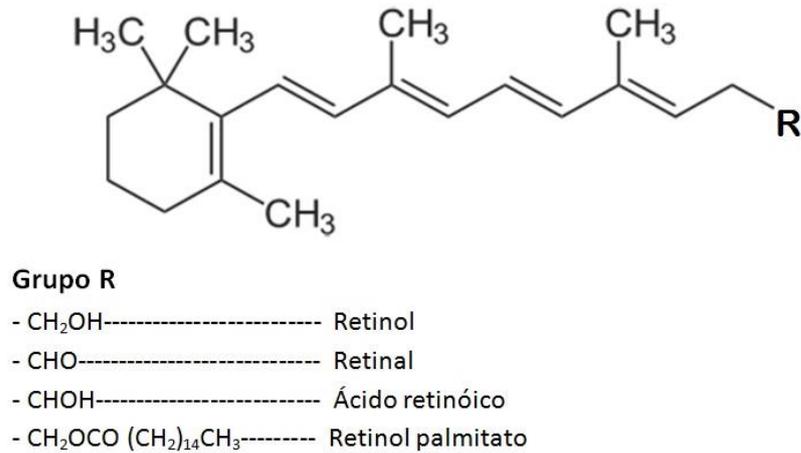


Figura 1 - Estrutura química de compostos com atividade biológica de vitamina A.

Fonte: Elaborado pelo autor

A forma primária de armazenamento de vitamina A no organismo é como retinil palmitato, uma vez que a esterificação protege o grupo hidroxila da oxidação. O retinol pode ser reversivelmente oxidado a retinal que, por sua vez, pode ser adicionalmente oxidado a ácido retinoico (SOLOMONS, 2012).

A vitamina A pode ser ingerida na dieta na forma de carotenoides provitamina A presentes em fontes vegetais ou de vitamina A pré-formada (retinol, ésteres de retinil e quantidades muito pequenas de ácido retinoico) através de alimentos de origem animal, como carnes, fígado, ovos e produtos lácteos (ROSS; HARRISON, 2007).

Os carotenoides estão presentes principalmente em vegetais verdes escuros ou amarelo-alaranjados e algumas frutas. Há mais de 700 carotenoides conhecidos, porém apenas cerca de 50 possuem atividade de vitamina A, sendo os principais o β -caroteno, o α -caroteno e a β -criptoxantina. Um anel β -ionona não substituído é necessário para esta função, por isso o licopeno é um exemplo de carotenoide que não possui propriedades de provitamina A, ou seja, não pode ser convertido a retinol no organismo (SOLOMONS, 2012) (Figura 2).

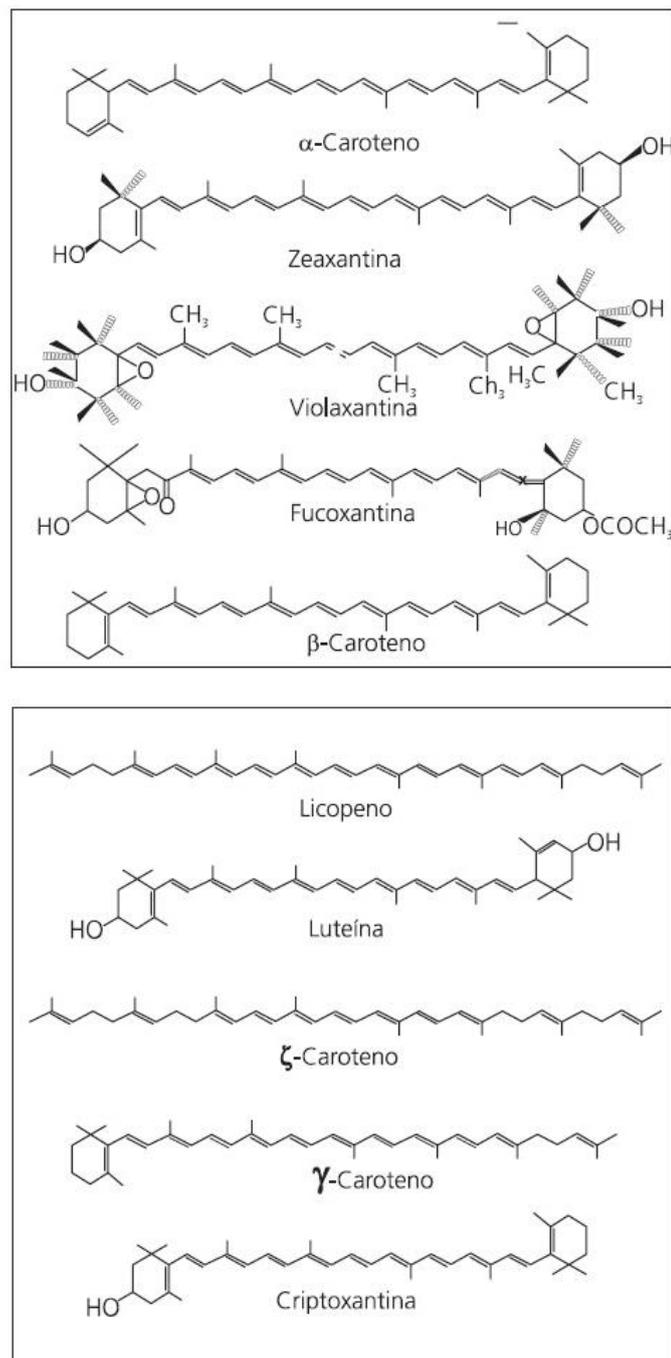


Figura 2 - Estrutura química de alguns carotenoides.

Fonte: AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006

O β-caroteno, por ser composto de duas partes simétricas, pode ter até metade do seu conteúdo convertido em retinol no organismo, através da sua clivagem central (YUYAMA et al., 2005). Entretanto, segundo Grune et al. (2010), altas doses (> 6 mg/dia) de provitamina A são necessárias para substituir o retinol pré-formado.

1.1.3. Absorção, transporte e metabolismo

A vitamina A é liberada da matriz alimentar por meio da ação de enzimas gástricas e intestinais, sendo absorvida na mucosa intestinal. A vitamina A pré-formada é absorvida mais eficientemente que os carotenoides provitamina A. Uma vez que ela é uma molécula lipossolúvel, necessita dos lipídeos como veículo de transporte e estimulantes do fluxo biliar, por isso a gordura da dieta tem influência sobre a sua absorção. Além disso, a biodisponibilidade do nutriente também depende da matriz alimentar, do processamento do alimento, da integridade da mucosa intestinal, presença de infecções e do estado nutricional do indivíduo, dentre outros fatores (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001; BELLOVINO et al., 2003; YUYAMA et al., 2005).

No lúmen intestinal, os carotenoides da dieta são clivados a retinal e convertidos a retinol. Os ésteres de retinil dietéticos também são hidrolisados a retinol, que é absorvido. Uma vez no enterócito, independente da sua origem dietética, o retinol se liga à proteína ligadora de retinol celular tipo II (RBP celular tipo II ou CRBP-II) e esse complexo serve como substrato para a reesterificação do retinol com ácidos graxos de cadeia longa, principalmente pela ação da enzima lecitina retinol aciltransferase (LRAT), que é largamente expressa nos tecidos. Os ésteres formados se incorporam aos quilomícrons, lipoproteínas intestinais contendo outros lipídeos dietéticos, e esses são secretados na linfa (BATTEN et al., 2004; SOLOMONS, 2012).

Quando atingem a circulação sanguínea, os quilomícrons sofrem a ação da enzima lipase lipoprotéica (LPL), que está ligada à superfície luminal do endotélio vascular e catalisa a lipólise dos triglicerídeos para gerar ácidos graxos livres e quilomícrons remanescentes (GOLDBERG; ECKEL; ABUMRAD 2009). Estes últimos, em sua maioria (75%), são captados pelo fígado, e o restante (25%) vai para tecidos extra-hepáticos, como o tecido adiposo e a glândula mamária lactante. Nos hepatócitos, os ésteres de retinil são hidrolisados a retinol, que pode ser reesterificado pela LRAT para armazenamento nas células estreladas ou ligado à sua proteína específica de transporte sérico e lançado de volta à corrente sanguínea (QUADRO et al., 2003; DEBIER; LARONDELLE, 2005).

A proteína ligadora de retinol (RBP) é uma proteína de 21 kDa sintetizada principalmente nos hepatócitos que possui um único sítio de ligação para uma

molécula de retinol todo-*trans*. Além de transportar o retinol hepático para os tecidos periféricos, a RBP serve para solubilizar a vitamina no soro, protegê-la da oxidação e manter sua concentração sérica constante. No plasma, a RBP circula complexada 1:1 com outra proteína sérica, a transtirretina (TTR), o que impede a sua perda excessiva pela filtração glomerular, viabilizando o fornecimento de retinol aos tecidos conforme a sua necessidade metabólica (QUADRO et al., 2003; SPIEGLER et al., 2012) (Figura 3).

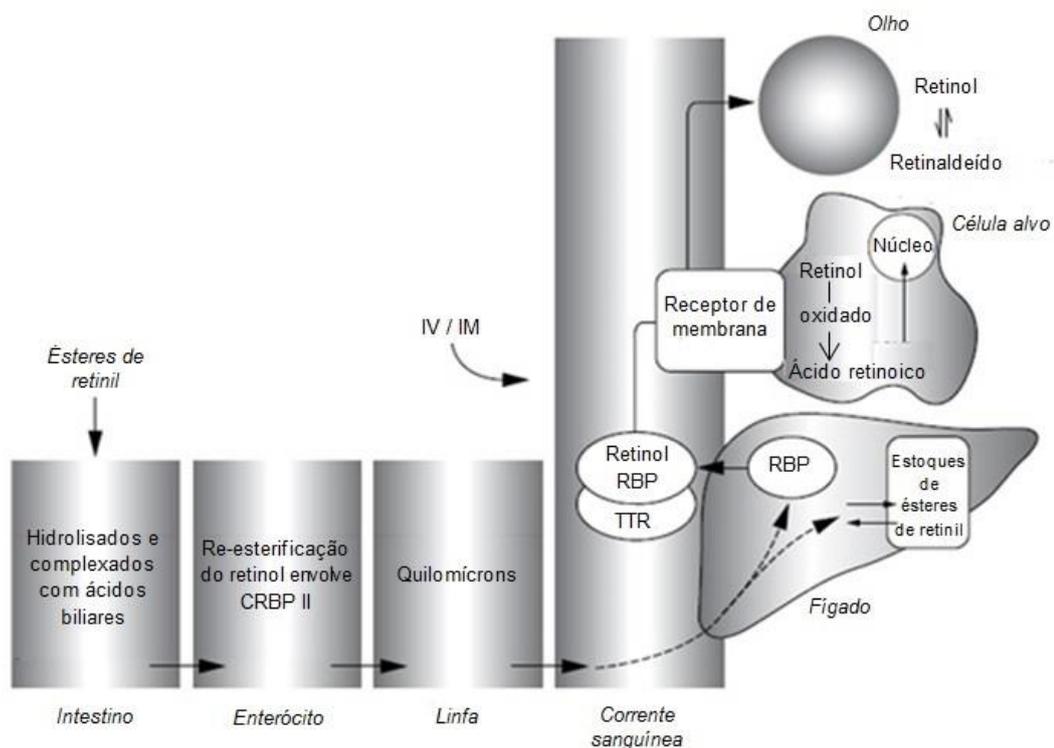


Figura 3 - Absorção, metabolismo e transporte do retinol no organismo.

Fonte: MACTIER; WEAVER, 2005. Adaptado pelo autor.

Em situações de jejum, o complexo RBP-retinol representa aproximadamente 95-99% dos retinoides circulantes. Após a ingestão dietética de vitamina A, entretanto, a concentração de retinoides nos quilomícons e remanescentes de quilomícons pode exceder a de retinol no plasma. Em situações normais, os níveis sanguíneos de RBP-retinol em humanos são mantidos constantes pelo fígado (BIESALSKI et al., 1999), porém esses mecanismos regulatórios ainda não são completamente entendidos.

A captação do retinol pelos tecidos pode ocorrer por transferência passiva através da bicamada fosfolipídica ou através de receptores celulares específicos para RBP (principalmente a Stra6, de *stimulated by retinoic acid gene 6 homolog*, uma proteína de membrana) expressos em vários tecidos, como a placenta e a glândula mamária (QUADRO et al., 2003, WOLF et al., 2007; KAWAGUCHI et al., 2007).

A transferência placentária de retinoides é pouco entendida, assim como o seu metabolismo nos tecidos em desenvolvimento, mas existem pelo menos duas maneiras pelas quais os retinoides são transferidos da mãe para o feto: a principal forma é pelo complexo RPB-retinol, mas ésteres de retinil também podem ser transportados sob a forma de quilomícrons remanescentes ou como uma parte de lipoproteínas de baixa ou muito baixa densidade (LDL, VLDL) (CLAGETT-DAME; KNUTSON, 2011).

Utilizando modelos animais, foi visto que a RBP não atravessa a placenta para a circulação fetal. Assim, o retinol materno deve ser transferido para a RBP fetal, ou alternativamente, o retinol pode ser esterificado na placenta e entregue aos tecidos em lipoproteínas. Em embriões mutantes nulos para RBP, a embriogênese não é prejudicada se houver uma dieta suficiente em vitamina A, porém quando a dieta materna é restrita nessa vitamina o desenvolvimento embrionário é perturbado. Portanto, na ausência de RBP, os ésteres de retinil circulantes parecem ser a principal via de transferência de retinoides da mãe para o embrião, desde que a dieta materna seja adequada em vitamina A (CLAGETT-DAME; KNUTSON, 2011).

Sugere-se que a placenta serve como um sítio de estoque de vitamina A até o fígado embrionário se tornar funcional e que funcionaria como um tampão, liberando retinol para o feto mesmo quando a ingestão materna está deficiente e estocando esse nutriente para proteger o embrião de um potencial efeito tóxico do excesso de retinoides na circulação materna (SAPIN et al., 2000).

Estudos em ratos mostram que a síntese da RBP fetal se inicia no final do terceiro trimestre gestacional, coincidindo com o aumento dos estoques hepáticos de vitamina A no feto. No soro, a taxa de concentração de retinol entre a mãe e o feto é cerca de 2:1 (MACTIER, 2013).

1.1.4. Funções e papel no desenvolvimento embrionário

A vitamina A tem funções importantes mediadas pelas suas diferentes formas. Carotenoides provitamina A, por exemplo, têm atividade antioxidante, pois podem reagir com radicais livres de oxigênio, exercendo efeito protetor (BERTI et al., 2011).

O retinal, proveniente da oxidação reversível do retinol catalisada por enzimas álcool desidrogenases (ADHs) ou retinol desidrogenases (RDHs), é essencial para o processo visual. Nos bastonetes, o 11-*cis*-retinal se liga à opsina, formando o pigmento visual rodopsina, cuja fotoisomerização induz a cascata de foto transdução em resposta à luz (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001; MACTIER; WEAVER, 2005).

O retinol pode, ainda, ser duplamente oxidado de forma irreversível a ácido retinoico (AR), pela ação de retinal desidrogenases (Raldhs) (DUESTER, 2008). A maioria das demais funções da vitamina A é mediada através da ação do AR na regulação da expressão gênica. Esse metabólito regula a expressão de genes diretamente pela ligação a um heterodímero de receptores nucleares de AR (RARs) e receptores X retinoides (RXRs), que se ligam aos elementos de resposta ao ácido retinoico (RAREs) na região regulatória de seus genes alvo (Figura 4). Um mecanismo alternativo do ácido retinoico para regular a expressão de genes é pela modulação da atividade de outros fatores de transcrição, através do heterodímero RAR/RXR, mas independente de RAREs (AUSTENAA et al. 2004).

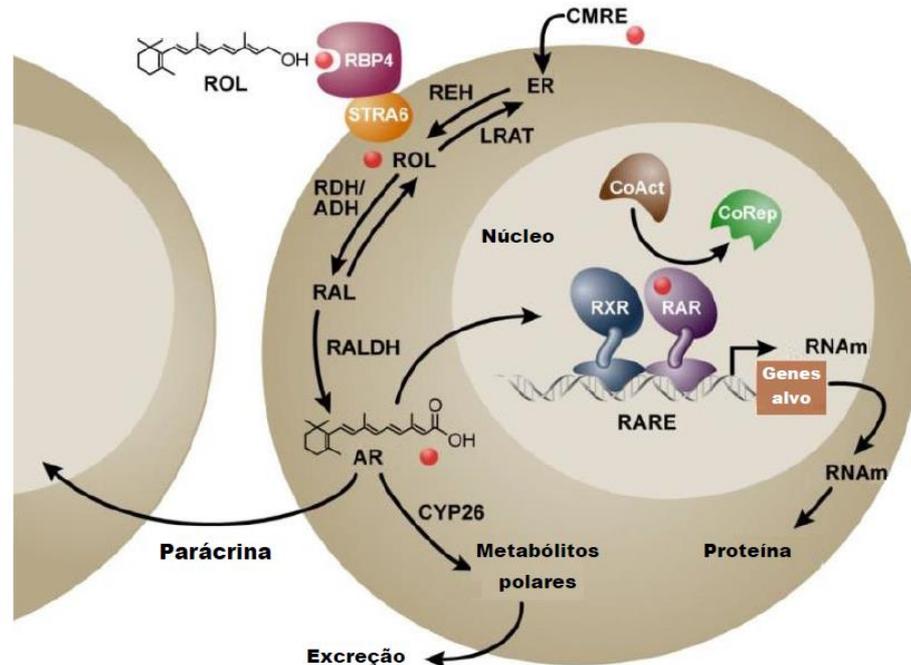


Figura 4 - Mecanismo de ação do ácido retinoico.

ROL: retinol / RAL: retinal / AR: ácido retinoico / ER: éster de retinil / CMRE: quilomícron remanescente / CoAct: Coativador / CoRep: Correpresor.

Fonte: CLAGETT-DAME; KNUTSON, 2011. Adaptado pelo autor.

Assim, o ácido retinoico tem participação em uma infinidade de processos, como desenvolvimento de tecidos e vértebras; codificação de proteínas da matriz celular, enzimas, receptores; imunidade; reprodução; crescimento; diferenciação celular e desenvolvimento embrionário (BERTI et al., 2011).

Estudos genéticos provam que o AR atua através de um mecanismo de sinalização RAR no desenvolvimento embrionário normal. Mais de 500 genes são conhecidos como sendo regulados pelo ácido retinoico e um grande número deles tem mostrado influenciar a formação de vários órgãos e estruturas, como membros, coração, pâncreas, olhos, medula espinhal, rins, pulmões e vias aéreas superiores (CLAGETT-DAME; KNUTSON, 2011; SPIEGLER et al., 2012).

Apesar da sua importância, o ácido retinoico em excesso durante estágios críticos do desenvolvimento embrionário pode ser teratogênico e até letal para o embrião. Malformações no sistema nervoso central, craniofaciais, cardiovasculares e no timo foram observadas em humanos quando as gestações ocorreram durante tratamento terapêutico com ácido retinoico (AZAIS-BRAESCO; PASCAL, 2000).

Portanto, alterações na disponibilidade de ácido retinoico, tanto no que diz respeito à deficiência quanto à hipervitaminose, podem levar a anormalidades no desenvolvimento. Por isso, um adequado suprimento de vitamina A é essencial para o desenvolvimento fetal e pós-natal (SPIEGLER et al., 2012).

1.1.5. Recomendações dietéticas de vitamina A

O requerimento médio de vitamina A é um valor estimado com base na garantia de estoques adequados desse nutriente, evitando risco de deficiência ou excesso. As recomendações de ingestão diária referem-se à quantidade a ser ingerida diariamente a fim de atingir o requerimento, diferindo de acordo com o sexo, idade e estado fisiológico do indivíduo (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

As *Dietary Reference Intakes* para vitamina A elaboradas pelo *Institute of Medicine* (2001) recomendam a ingestão de 700 µg/dia para mulheres acima de 14 anos, aumentando para 770 µg/dia na gestação e 1300 µg/dia na lactação, para mulheres de 19 a 50 anos (Quadro 1).

Quadro 1 - Recomendações dietéticas (RDA e AI) de vitamina A para indivíduos em diferentes estágios de vida.

| Estágios da vida | RDA/AI* (µg/dia) |
|------------------|------------------|
| Bebês | |
| 0 a 6 meses | 400* |
| 7 a 12 meses | 500* |
| Mulheres | |
| 14 a 18 anos | 700 |
| Acima de 19 anos | 700 |
| Gestantes | |
| ≤ 18 anos | 750 |
| 19 a 50 anos | 770 |
| Lactantes | |
| ≤ 18 anos | 1200 |
| 19 a 50 anos | 1300 |

RDA: *Recommended dietary allowance*/ AI: *Adequate intake*

Fonte: *Institute of Medicine (IOM)*, 2001.

Para bebês de 0 a 6 meses, uma vez que o requerimento médio de vitamina A ainda não pôde ser determinado e, portanto, a recomendação de ingestão não foi estabelecida, um parâmetro provisório de referência, a ingestão adequada (AI), é utilizado na avaliação ou prescrição de consumo (VITOLLO, 2008). A AI da vitamina nessa faixa etária foi calculada com base na quantidade média de 1,70 $\mu\text{mol/L}$ ou 48,5 $\mu\text{g/dL}$ de vitamina A no leite humano consumido durante os primeiros seis meses de lactação (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

Segundo as novas diretrizes da Organização Mundial da Saúde, a suplementação de vitamina A em mulheres no pós-parto, neonatos (0-28 dias de vida) e bebês de 1 a 5 meses não é recomendada como uma intervenção de saúde pública para prevenção da morbidade e mortalidade materna e infantil. Ao invés disso, é recomendado que as mulheres no pós-parto continuem recebendo nutrição adequada pelo consumo de uma dieta alimentar saudável e equilibrada; e que o aleitamento materno exclusivo seja encorajado durante os primeiros 6 meses pós-parto, para que não haja deficiência materna e os bebês atinjam o crescimento, desenvolvimento e saúde ideais (OMS, 2013a; OMS, 2013b; OMS, 2013c).

1.2. DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A

Lactentes, mulheres gestantes e lactantes são considerados grupos de risco para a deficiência de vitamina A (DVA) (WEST, 2002). A DVA é um problema global de saúde pública significativa em países em desenvolvimento, ficando atrás apenas da anemia ferropriva. As mais altas prevalências de hipovitaminose A são vistas no sul da Ásia e na África subsaariana (AJAYEOBA, 2001; COZZOLINO, 2012).

A hipovitaminose A causa ceratinização de epitélios, afetando os olhos e o revestimento dos tratos gastrointestinal, respiratório e do aparelho geniturinário, afetando também a integridade do sistema imune (GERALDO et al., 2003). Segundo a Organização Mundial da Saúde, essa deficiência afeta 190 milhões de crianças em idade pré-escolar e 19 milhões de mulheres gestantes ao redor do mundo, tornando maior o risco de infecções como diarreia, sarampo e infecções respiratórias (WHO, 2009).

Anualmente, mais de 6 milhões de mulheres em países em desenvolvimento desenvolvem cegueira noturna durante a gestação e mais de 4 milhões de pré-

escolares têm algum estágio de xerofthalmia devido à ceratinização das células do epitélio corneal (SOLOMONS, 2012). Sarni et al. (2002) enfatizam que a hipovitaminose A é a principal causa de cegueira evitável no mundo e, segundo Chagas et al. (2003), esta carência é a responsável direta pela morte de mais de dois milhões de crianças nos primeiros anos de vida.

A DVA crônica pode aumentar o risco de complicações e morte durante a gestação e no período pós-parto (CHECKLEY et al., 2010). Autores relatam que a DVA durante a gestação parece estar associada ao nascimento prematuro, baixo peso ao nascer e baixos estoques hepáticos da vitamina (GAZALA et al., 2003; STROBEL; TINZ; BIESALSKI, 2007).

O problema da deficiência de vitamina A pode ser avaliado mediante a utilização de sinais e sintomas clínico-oculares; indicadores histológicos; dietéticos e bioquímicos, como sua concentração plasmática e no leite materno (QUEIROZ, 2001).

Em adultos e crianças, inclusive neonatos, a suficiência de vitamina A é definida como concentrações plasmáticas iguais ou superiores a 0,70 $\mu\text{mol/L}$ (20 $\mu\text{g/dL}$). Concentrações plasmáticas de retinol abaixo de 0,35 $\mu\text{mol/L}$ (10 $\mu\text{g/dL}$) são associadas com estoques hepáticos reduzidos, e sinais clínicos de DVA são considerados indicativos de deficiência severa (MACTIER; WEAVER, 2005).

Para o indicador retinol no leite materno, são considerados adequados valores acima de 1,05 $\mu\text{mol/L}$ (30 $\mu\text{g/dL}$) no leite maduro (WEST, 2002).

1.3. ALEITAMENTO MATERNO E VITAMINA A

Um dos aspectos que envolvem a adaptação do recém-nascido ao ambiente extrauterino é a descontinuação abrupta do suporte nutricional parenteral por via umbilical e sua substituição pelo suporte enteral com o leite humano (LH). O LH é um fluido complexo que fornece nutrientes e compostos bioativos que facilitam as modificações adaptativas e funcionais necessárias à ótima transição para a vida extrauterina (CAMELO JR.; MARTINEZ, 2008).

Assim, o leite materno é a melhor forma de alimentação para o recém-nascido, por possuir características nutricionais ideais, com uma combinação adequada de macro e micronutrientes, e oferecer vantagens imunológicas e

psicológicas importantes para a redução da morbimortalidade infantil, além de possuir baixo custo (MARQUES, 2004). A ausência do LH nessa fase da vida acarreta o aumento da incidência de moléstias infecciosas como diarreia, infecções respiratórias e do trato urinário, bacteremia, otite média e enterocolite necrosante (CAMELO JR.; MARTINEZ, 2008).

Por essas razões, a Organização Mundial da Saúde recomenda o aleitamento materno exclusivo durante os primeiros seis meses pós-parto e complementar até dois anos ou mais (WHO, 2001).

Mais de 200 componentes fazem parte do leite humano, estando presentes em proporções e formas químicas diferentes em relação ao que é encontrado no leite de outras espécies. Acredita-se que isso esteja relacionado à diferença no requerimento entre as espécies, o que é reforçado quando se observa as próprias alterações que ocorrem no LH ao longo da lactação e em função da maturidade do recém-nascido (EUCLYDES, 2000).

O colostro é a primeira secreção láctea, que permanece até o 4º ou 6º dia pós-parto. É um líquido espesso e, geralmente, possui coloração amarelada, devido ao seu alto teor de carotenoides. O colostro contém maior conteúdo proteico e de minerais e menos gordura e carboidratos do que o leite maduro. Além disso, é rico em anticorpos, protegendo o recém-nascido contra infecções (NASCIMENTO; ISSLER, 2003).

Do 7º ao 21º dia pós-parto, durante os quais o leite é chamado “leite de transição”, ocorrem maiores alterações na composição láctea. Em torno do 21º dia, a composição do leite torna-se mais estável, passando a ser caracterizado como maduro (OMS, 2013a).

O conteúdo de vitaminas do leite materno varia ao longo das fases de lactação, apresentando rápido declínio das vitaminas lipossolúveis à medida que o conteúdo de lipídeos aumenta. Dessa forma, o conteúdo das vitaminas lipossolúveis é superior no colostro quando comparado às outras fases (MACIAS; SCHWIEGERT, 2001; SCHWIEGERT et al., 2004).

Apesar desse declínio, o leite materno, especialmente o colostro, é considerado a mais importante fonte de vitamina A para multiplicar as reservas hepáticas do recém-nascido nos primeiros meses pós-parto, sendo o grande protetor contra a deficiência infantil desse nutriente (MARTINS et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais a vitamina A é transferida para a glândula mamária e secretada no leite humano não são totalmente compreendidos. Em modelos animais foi visto que essa vitamina chega ao leite tanto pelos quilomícrons quanto através do complexo RBP-retinol, sendo transferido para a glândula mamária por meio de receptores de RBP. Na glândula mamária, o retinol é reesterificado e secretado no leite como ésteres de retinil (ROSS; PASSATIEMPO; GREEN, 2004; O'BYRNE et al., 2010) (Figura 5).

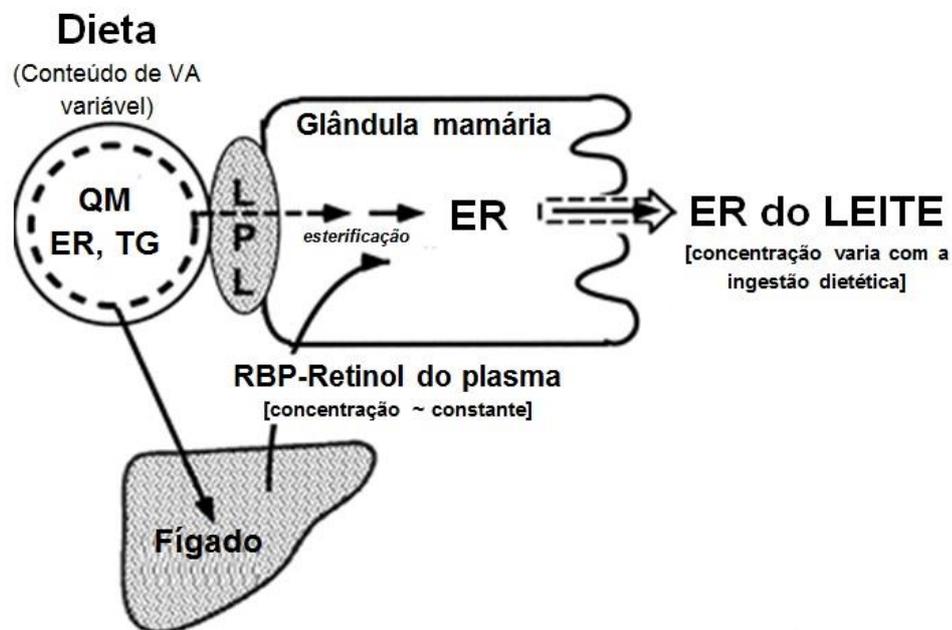


Figura 5 - Esquema da transferência de retinol para a glândula mamária.

VA: Vitamina A / QM: quilomícrons / ER: ésteres de retinil / TG: triglicerídeos / LPL: lipoproteína lipase

Fonte: ROSS; PASSATIEMPO; GREEN, 2004. Adaptado pelo autor.

Segundo Quiles et al. (2006), a composição do leite humano pode ser influenciada por diferentes fatores, como características genéticas, hábitos dietéticos, estado nutricional e socioeconômico materno e duração da lactação. A prematuridade é outro fator que pode alterar a composição de nutrientes do leite materno (BAUER; GERSS, 2011).

1.4. PREMATURIDADE E VITAMINA A

A prematuridade, caracterizada pelo nascimento antes de 37 semanas gestacionais (pré-termo), é o problema perinatal atual mais importante, uma vez que está associado à morbimortalidade significativa no início da vida (SAIGAL; DOYLE, 2008).

O parto pré-termo pode ser espontâneo ou medicamente induzido. O espontâneo é precedido por (1) trabalho de parto prematuro com membranas intactas ou (2) devido à ruptura prematura de membranas, independente de o parto ser vaginal ou cesariano; e o medicamente induzido ocorre por indicação materna ou fetal, sendo iniciado (1) com medicamentos ou (2) por cesariana sem trabalho de parto (BETTIOL; BARBIERI; SILVA, 2010).

A etiologia do nascimento pré-termo não é totalmente conhecida. Fatores de risco clássicos como infecções, parto múltiplo, doença hipertensiva específica da gestação, tabagismo e uso de drogas ilícitas, trabalho extenuante, baixo índice de massa corpórea, ganho de peso insuficiente na gravidez, reprodução assistida, colo uterino curto, intervalo interpartal curto, história anterior de nascimento pré-termo e fatores socioeconômicos têm sido responsabilizados por apenas um terço dos nascimentos prematuros. O parto pré-termo também pode se associar à determinação incorreta da idade gestacional baseada em exames ultrassonográficos e à baixa qualidade da assistência pré-natal, falhando no controle de infecções que levam à ruptura prematura das membranas. Outro fator pouco estudado, porém que é sugerido como potente fator de risco é o estresse materno pré-natal (BETTIOL; BARBIERI; SILVA, 2010).

Entre os dez países com maior incidência de prematuridade estão o Brasil, os Estados Unidos, Índia e Nigéria, mostrando que este é um importante problema global (WHO, 2012) (Figura 6). A prevalência de nascimentos pré-termo é elevada e aumenta a cada ano, inclusive em países desenvolvidos. Acredita-se que a maior intervenção médica recente contribuiu para o aumento dessa prevalência, tanto pelo aumento na indicação de parto prematuro como devido a gestações múltiplas concebidas artificialmente (GOLDENBERG et al., 2008).

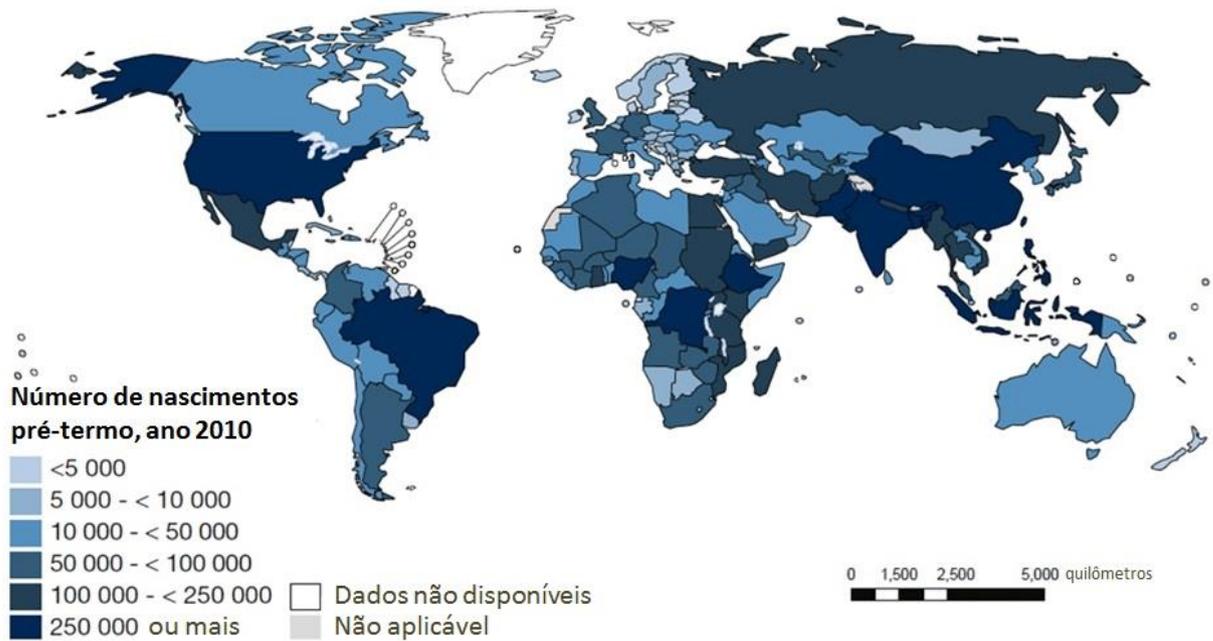


Figura 6 - Número estimado de nascimentos pré-termo no mundo em 2010.

Fonte: World Health Organization, 2012. Adaptado pelo autor

Complicações decorrentes do nascimento prematuro são a principal causa de morte neonatal (0 a 28 dias) e de crianças menores de 5 anos (LIU et al., 2012; LIU et al., 2015). Em 2010, ocorreram cerca de 15 milhões de nascimentos prematuros no mundo, dos quais mais de 1 milhão tiveram o óbito como desfecho, especialmente por infecções (BLENCOWE et al., 2012). Muitos bebês que sobrevivem necessitam de cuidados especiais e enfrentam maior risco de problemas de saúde, como paralisia cerebral, deficiência intelectual, doença pulmonar crônica, perda visual e auditiva (WHO, 2006).

Os prematuros apresentam maior risco de mortalidade quanto menor a idade gestacional, porque no terceiro trimestre de gestação ocorre um grande desenvolvimento do feto, com aumento da massa óssea, muscular e de gordura. Além disso, é no final da gestação que se completa o desenvolvimento pulmonar do feto (AULER; DELPINO, 2008).

Há indícios de que a vitamina A também se acumula no feto durante o terceiro trimestre gestacional, paralelamente ao aumento da gordura corpórea total (BAYDAS et al., 2002; TOKUSOGLU et al., 2008; KOSITAMONGKOL et al., 2011). Assim, recém-nascidos prematuros ou com baixo peso podem apresentar um maior

risco de deficiência de vitamina A, estando mais propensos a doenças oculares e dos tratos gastrintestinal e respiratório (MACTIER; WEAVER, 2005).

Além disso, devido à sua mudança do ambiente uterino para um ambiente hiperoxêmico, os recém-nascidos são propensos ao estresse oxidativo, aumentando a sua necessidade de antioxidantes (QUILES et al., 2006). No neonato prematuro isso é agravado, pois seus sistemas antioxidantes são mais imaturos e eles são mais expostos às espécies reativas de oxigênio, devido a uma maior incidência de infecções e à utilização de ventilação mecânica e nutrição intravenosa (BUONOCORE et al., 2002; PERRONE et al., 2007).

Complicações neonatais em prematuros, como hemorragia intraventricular, retinopatia da prematuridade, aumento do risco de infecções e displasia bronco pulmonar (doença pulmonar crônica) estão associadas a baixos níveis de vitamina A (MACTIER; WEAVER, 2005). O pulmão do neonato pré-termo é deficiente nessa vitamina ao nascimento e os seus requerimentos pulmonares do nutriente são relativamente altos nas primeiras semanas de vida (MACTIER, 2013).

A fim de evitar o desenvolvimento de complicações clínicas em decorrência do estresse oxidativo, agravado pela possível deficiência de vitamina A no neonato prematuro, é necessário supri-lo adequadamente com esta vitamina. Neste contexto, destaca-se a importância do aleitamento para o neonato pré-termo, que deve fornecer quantidade suficiente de vitamina A para atender às necessidades do lactente e para formação das suas reservas hepáticas (AKOHOUE; GREEN; GREEN, 2005; AZEREDO; TRUGO, 2008).

A recomendação da utilização do leite humano é estendida também para prematuros, especialmente aquele oferecido cru, que tem função importante no desenvolvimento do sistema imune desses recém-nascidos. Por isso, o leite da própria mãe seria o ideal para o recém-nascido pré-termo (CAMELO JR.; MARTINEZ, 2008).

Assim, o monitoramento e melhora do estado de vitamina A de mulheres durante esse período crítico pode ajudar a melhorar os estoques hepáticos de vitamina A em crianças através do fornecimento de uma quantidade adequada da vitamina no leite materno, evitando assim as consequências da deficiência desse micronutriente (ORTEGA et al., 1997).

Segundo Auvvag et al. (2007), o conteúdo de vitamina A do leite humano é muito baixo para atender à alta exigência de recém-nascidos prematuros de muito

baixo peso pelo nutriente. Porém, ainda são escassos os estudos a respeito do conteúdo de retinol no leite materno de parturientes pré-termo, principalmente com desenho longitudinal.

Além disso, em recém-nascidos pré-termo não é clara a relação ao nascimento entre a idade gestacional e as concentrações séricas ou hepáticas de retinol. Assim, dados sobre o estado nutricional sérico materno e de neonatos pré-termo são importantes, a fim de se avaliar a relação entre a prematuridade e os níveis séricos de retinol no binômio mãe-filho, e também entre o estado nutricional em vitamina A materno e do recém-nascido, para que haja uma melhor compreensão acerca da transferência placentária desta vitamina para o feto.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a concentração de retinol no leite materno e no soro de mães e recém-nascidos prematuros e a termo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as lactantes e os recém-nascidos envolvidos no estudo, com base em variáveis maternas, obstétricas e do neonato;
- Verificar a concentração de retinol sérico em parturientes e seus recém-nascidos prematuros e a termo, por meio da análise do soro materno e do soro do cordão umbilical;
- Determinar a concentração de retinol no leite materno de mulheres com parto pré-termo e a termo;
- Comparar as variáveis analisadas (retinol no soro de cordão umbilical, soro materno e leite colostro) entre os grupos a termo e pré-termo;
- Verificar a adequação do leite nas suas diferentes fases às recomendações de ingestão de vitamina A para lactentes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL DE LABORATÓRIO

- Seringas hipodérmicas de 5 mL;
- Agulhas hipodérmicas 25 x 0,70 mm;
- Pipetas descartáveis de 5 mL;
- Luvas de procedimento tamanho P e M;
- Algodão;
- Caixas térmicas 5 litros;
- Bolsas térmicas 7,5 litros;
- Gelos reutilizáveis 500 mL e 1000 mL GeloTech® (Pinhais, Brasil);
- Tubos de centrifugação em polipropileno 15mL fundo cônico com tampa de rosca e graduado Plast Bio® (Curitiba, Brasil);
- Tubos de centrifugação em polipropileno 5mL fundo plano com tampa de rosca e graduado Plast Bio® (Curitiba, Brasil);
- Padrão de *all-trans* retinol sintético Sigma® (Saint Louis, EUA);
- Álcool etílico 95% Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil);
- Hidróxido de potássio lentilhas Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil);
- Hexano P.A. Merk®, (São Paulo, Brasil);
- Álcool etílico absoluto grau HPLC Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil);
- Álcool metílico grau HPLC J.T. Baker®, VWR International (Radnor, EUA).
- Balança de precisão Mod. AY220 Shimadzu Corporation® (Quioto, Japão);
- Balança semi-analítica 300g Mod. JA3003N Bioprecisa® (Curitiba, Brasil);
- Banho Maria microprocessador Mod.Q215M2 QUIMIS®. (Diadema, Brasil);
- Agitador de tubos Mod. LSM56-I I-AZC (2006) LOGEN Scientific® (São Paulo, Brasil);
- Capela de exaustão QUIMIS® (Diadema, Brasil);
- Centrífuga 20 x 15 mL Excelsa II Mod.206 BL FANEM® (São Paulo, Brasil);
- Destilador de água Mod. Q341.25 QUIMIS® (Diadema, Brasil);
- Espectrofotômetro Ultrospec Mod. 2100 pro Amersham Biosciences® (Pittsburgh, EUA).

- Cromatógrafo LC-20 AT, com *loop* injetor de 20 μ L, comunicador CBM 20A, detector SPD-20A UV-VIS e programa LC Solution - Shimadzu Corporation® (Quioto, Japão).
- Coluna de fase reversa Luna 5u C18(2) 100A 250 mm x 4,6 mm Phenomenex® (Torrance, EUA).

3.2. CARACTERIZAÇÃO E ÉTICA DO ESTUDO

Foi um estudo longitudinal observacional do tipo caso-controle, no qual a amostra foi composta por parturientes voluntárias e seus recém-nascidos pré-termo e a termo, que receberam atendimento na Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC) (Natal/RN) e no Hospital Universitário Ana Bezerra (HUAB) (Santa Cruz/RN).

O estudo obteve anuência prévia dos dois hospitais envolvidos e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte em 20 de novembro de 2013, através do parecer 461.771 (CAAE 19864513.7.0000.5537). As mulheres que aceitaram participar do estudo deram a sua autorização para coleta de dados maternos e do neonato através da assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para maiores e menores de idade, respectivamente (APÊNDICES A e B).

3.3. CÁLCULO AMOSTRAL

O tamanho mínimo calculado da amostra foi de 68 participantes, sendo 34 participantes pré-termo e 34 do grupo a termo. O cálculo foi realizado utilizando o pacote estatístico G*Power V.3.1.7 (FAUL et al., 2007), considerando a aplicação do teste *t* bicaudal, conforme a proposta do estudo, e os seguintes parâmetros: valor alfa igual a 5%, poder esperado em 80% e o valor da medida de efeito igual a 0,7.

Para análise longitudinal do retinol no leite ao longo das fases de lactação, com base em dois parâmetros fixos (alfa = 0,05 e poder = 0,8) e para um efeito esperado de 0,25 a amostra mínima necessária era de 28 casos, considerando 3 medidas e a aplicação do teste de Análise de variância (FAUL et al., 2007).

3.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram convidadas a participar do estudo mulheres com idade entre 18 e 40 anos; sem doenças do trato gastrointestinal, hepáticas, neurológicas ou infecciosas, sífilis, HIV positivo, cardiopatias e neoplasias; que deram à luz a conceito único sem má-formação; não consumiram álcool, tabaco ou medicamentos corticosteroides na gestação; e não utilizaram suplementos contendo vitamina A durante a gravidez e no pós-parto imediato (durante o período das coletas).

Parturientes e seus recém-nascidos com idade gestacional igual ou superior a 37 semanas foram alocados no grupo termo (GT), enquanto mulheres e seus bebês que nasceram com menos de 37 semanas de gestação fizeram parte do grupo pré-termo (GPT).

3.5. COLETA DE DADOS E PREPARO DAS AMOSTRAS

As mulheres foram arroladas para o estudo entre novembro de 2013 e fevereiro de 2015.

A coleta de sangue do cordão umbilical foi realizada pelas equipes das salas de parto dos hospitais. Para essa coleta, logo após o nascimento o cordão foi pinçado o mais próximo possível ao recém-nascido. Depois de seccionado, foi mantida uma pinça prendendo o fluxo sanguíneo do segmento que leva à placenta. A coleta foi realizada com a placenta ainda *in útero* ou após a sua dequitação (exútero). Neste último caso, a punção do cordão foi realizada em aproximadamente 2 a 3 minutos após a suspensão da placenta, tempo necessário para o ingurgitamento do cordão (a placenta é suspensa para facilitar a drenagem do sangue pela força da gravidade). O cordão foi puncionado na parte distal mais próxima à pinça e foram coletados aproximadamente 2 mL de sangue.

As puérperas admitidas nas enfermarias das maternidades cujas amostras de sangue do cordão umbilical foram coletadas passaram por uma triagem feita pelos pesquisadores e aquelas que não se encaixaram nos critérios do estudo foram excluídas, sendo feito o descarte seguro das amostras de sangue. As demais foram esclarecidas sobre a pesquisa e, após assinatura dos TCLE, deu-se seguimento à coleta de dados.

Através de um formulário padronizado (APÊNDICE C), foram obtidas informações socioeconômicas, dados do pré-natal, do parto e do neonato, como idade gestacional e antropometria. A idade gestacional (IG) do recém-nascido, expressa em semanas, foi obtida a partir da data da última menstruação, quando considerada informação segura ou, na ausência dessa informação, por dados de ultrassonografias; e confirmada no prontuário do bebê após o parto, quando é realizado o cálculo da IG através do método de Capurro (CAPURRO et al., 1978).

Foram colhidos 5 mL de sangue da mãe após o parto, por punção venosa, o que foi feito por um profissional habilitado, técnico em enfermagem participante do projeto ou funcionário da maternidade.

Também foram coletados 2 mL de leite colostro, até 72 horas após o parto. Entre o 7º e o 15º dias pós-parto (dpp), foram coletados 2 mL de leite de transição e entre o 30º e o 55º dpp, 2 mL de leite maduro.

As coletas de leite de transição e maduro foram realizadas apenas com as parturientes pré-termo, uma vez que o grupo a termo recebeu alta em média 48 horas após o parto e, em virtude de seus recém-nascidos não serem de risco, as consultas no puerpério eram realizadas na atenção básica de outros locais. Assim, por questões éticas, essas mulheres receberam uma megadose de vitamina A – 200.000 UI (60 mg) de palmitato de retinila – preconizada pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2005) antes da alta hospitalar, inviabilizando as coletas posteriores.

No GPT, muitas mulheres ficaram na maternidade no período de coletas (em razão da permanência dos recém-nascidos em UTI neonatal). Outras, mesmo recebendo alta, ficaram com consultas marcadas no ambulatório do hospital para acompanhamento dos seus bebês prematuros e, portanto, a suplementação de vitamina A recomendada pelo programa governamental podia ser feita posteriormente, desde que estivesse dentro período pós-parto seguro para suplementação (ausência de possibilidade de gravidez) (Figura 7).

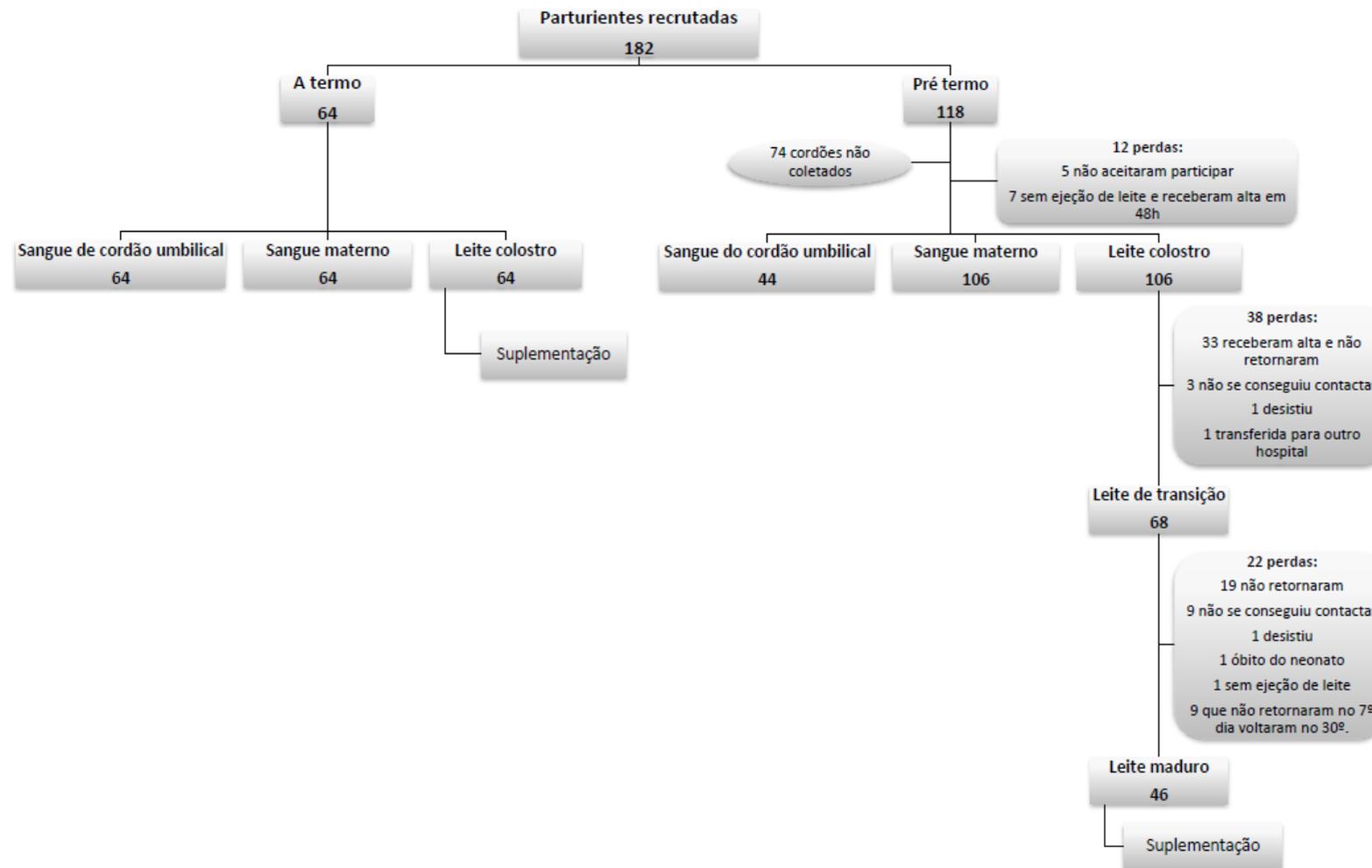


Figura 7 - Fluxograma de coleta de amostras biológicas dos grupos termo e pré-termo.

O leite foi ordenhado manualmente de mama não sugada previamente, e as primeiras gotas foram desprezadas, para evitar variações nos teores de gordura e retinol. Todas as coletas foram feitas com as mulheres em jejum e as amostras colocadas em tubos de polipropileno protegidos da luz e devidamente identificados com o código de cada parturiente.

As amostras de sangue coletadas no HUAB foram levadas para o Laboratório de Análises Clínicas do hospital e centrifugadas (500 x *g*) durante 10 minutos para separação do soro. Este foi armazenado a -20°C e posteriormente transportado sob refrigeração para o Laboratório de Alimentos e Bioquímica da Nutrição (LABAN) do Departamento de Bioquímica da UFRN, onde 1 mL foi utilizado para análise do retinol.

As amostras de sangue colhidas na MEJC foram transportadas em temperatura de refrigeração para o LABAN e passaram pelo mesmo processo para remoção do soro, que foi armazenado a -20°C até o momento das análises.

O leite materno foi submetido a agitação e separação de 500 µL (colostró) ou 1 mL (leites de transição e maduro) para determinação do retinol, sendo também armazenado a -20°C até as análises. O volume restante de soro e leite foi armazenado como reserva até o final do estudo.

3.6. ANÁLISE DO RETINOL

3.6.1. Extração de retinol do leite

O retinol foi extraído das amostras de leite seguindo uma adaptação do método de Giuliano et al. (1992), conforme descrito a seguir: a uma alíquota de leite foi acrescentado igual volume de álcool etílico a 95% e o tubo foi agitado para que houvesse desnaturação e precipitação proteica. Em seguida, foi adicionado igual volume de hidróxido de potássio (KOH) a 50% v/v para a etapa de hidrólise alcalina dos ésteres de retinol. A amostra foi agitada por e mantida em banho-maria a 60°C durante 1 hora, sob agitação. Finalizada esta etapa, foram adicionados 2 mL de hexano para extração do retinol. Após a adição do reagente, a amostra foi agitada e centrifugada (500 x *g*), sendo a camada hexânica removida para um segundo tubo. Este processo foi realizado três vezes, totalizando 6 mL de fase hexânica extraída,

dos quais 3 mL foram evaporados em banho-maria a 37°C. No momento da análise, o extrato seco foi dissolvido em 250 µL de etanol absoluto e 20 µL foram aplicados no aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Figura 8).

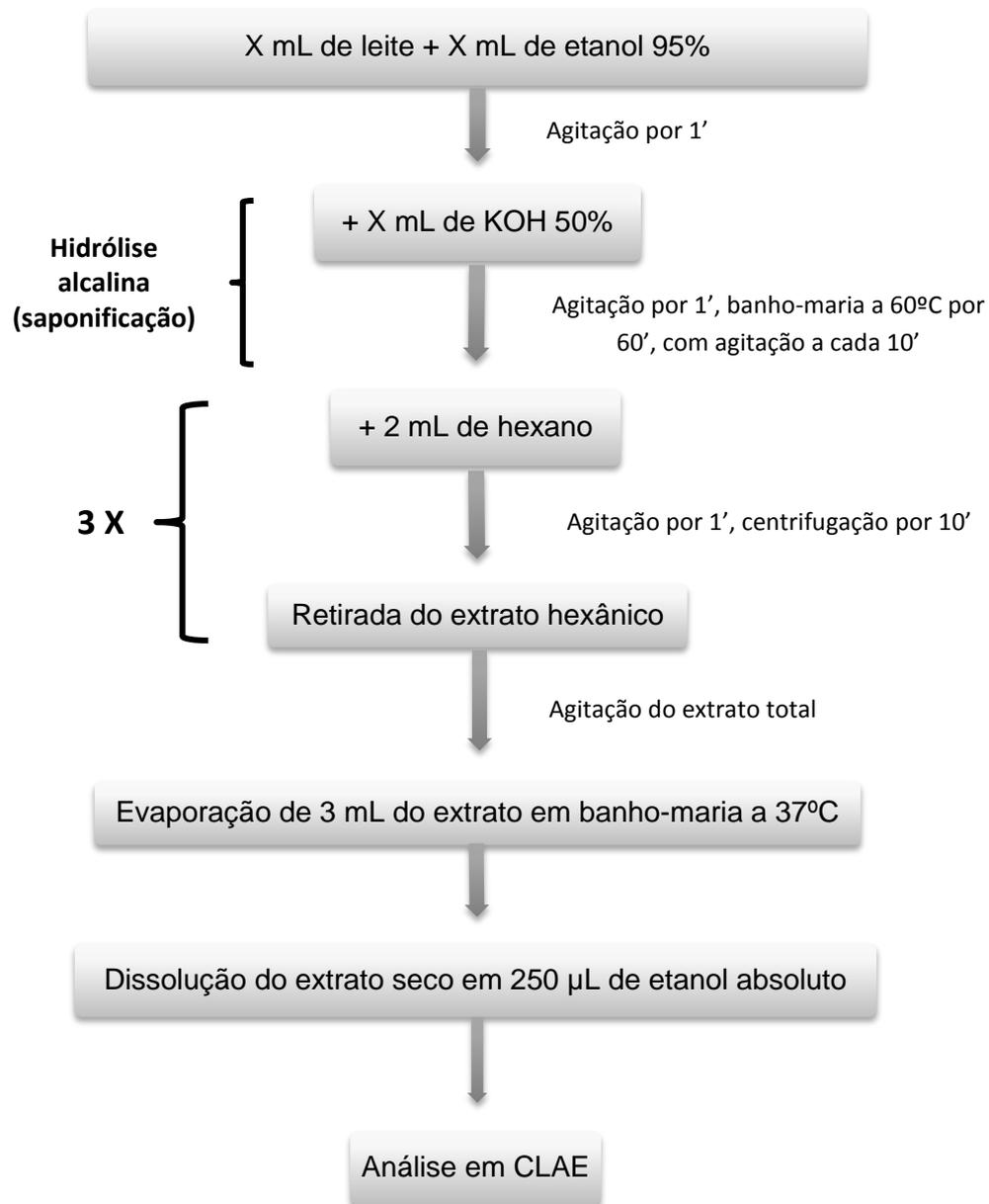


Figura 8 - Esquema da extração de retinol das amostras de leite materno.

3.6.2. Extração de retinol do soro

O retinol foi extraído das amostras de soro de forma semelhante, de acordo com adaptação do método de Ortega et al. (1998): a uma alíquota de 1 mL de soro, foi adicionado 1 mL de etanol a 95% para precipitação das proteínas. Após agitação, foi feita a extração com 6 mL de hexano e evaporação de 3 mL do extrato em banho-maria a 37° C. No momento da análise, o extrato seco foi dissolvido em 250 µL de etanol absoluto e 20 µL aplicados no aparelho de CLAE (Figura 9).

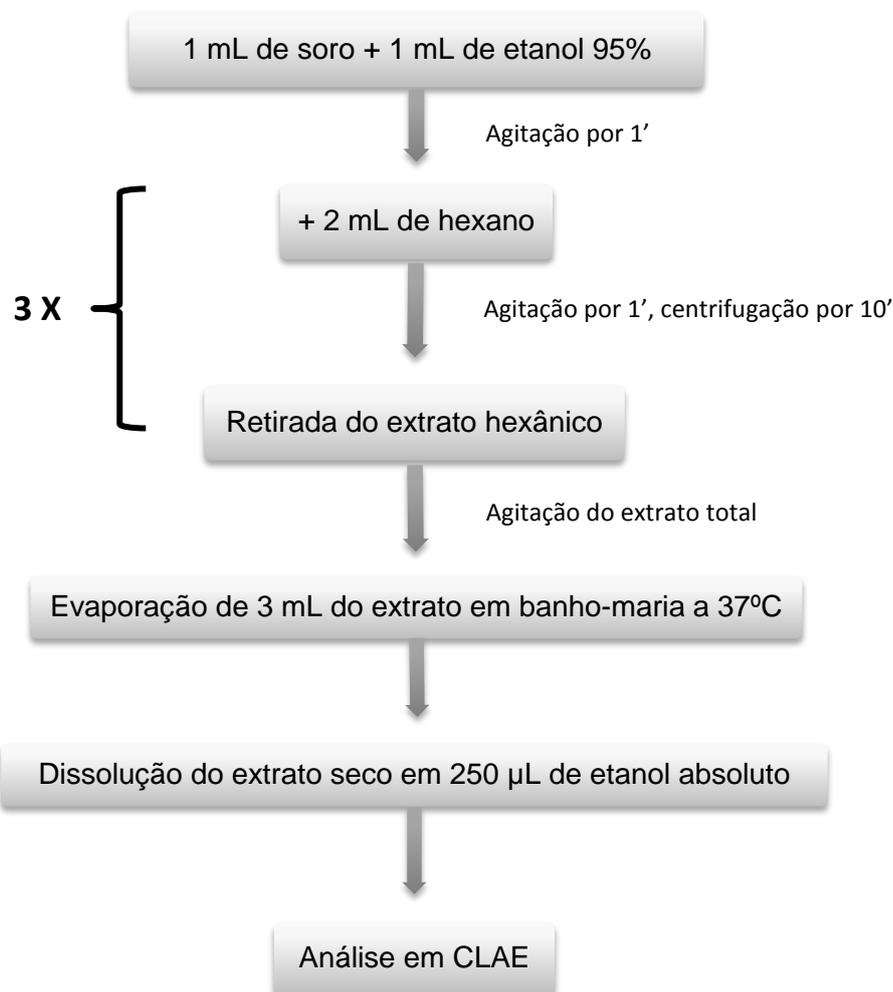


Figura 9 - Esquema da extração de retinol das amostras de soro materno e do cordão umbilical.

3.6.3. Condições cromatográficas

As concentrações de retinol das amostras de soro e leite foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com comprimento de onda de 325 nm. A eluição foi isocrática, com fase móvel de metanol 100% a um fluxo de 1 mL/min.

Uma solução padrão de retinol com concentração confirmada pelo coeficiente de extinção específico em etanol absoluto, ϵ 1%, 1 cm = 1780 (MILNE; BOTNEN, 1986) foi aplicada previamente a todas as análises. A identificação e quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas com a área do padrão (Figura 10).

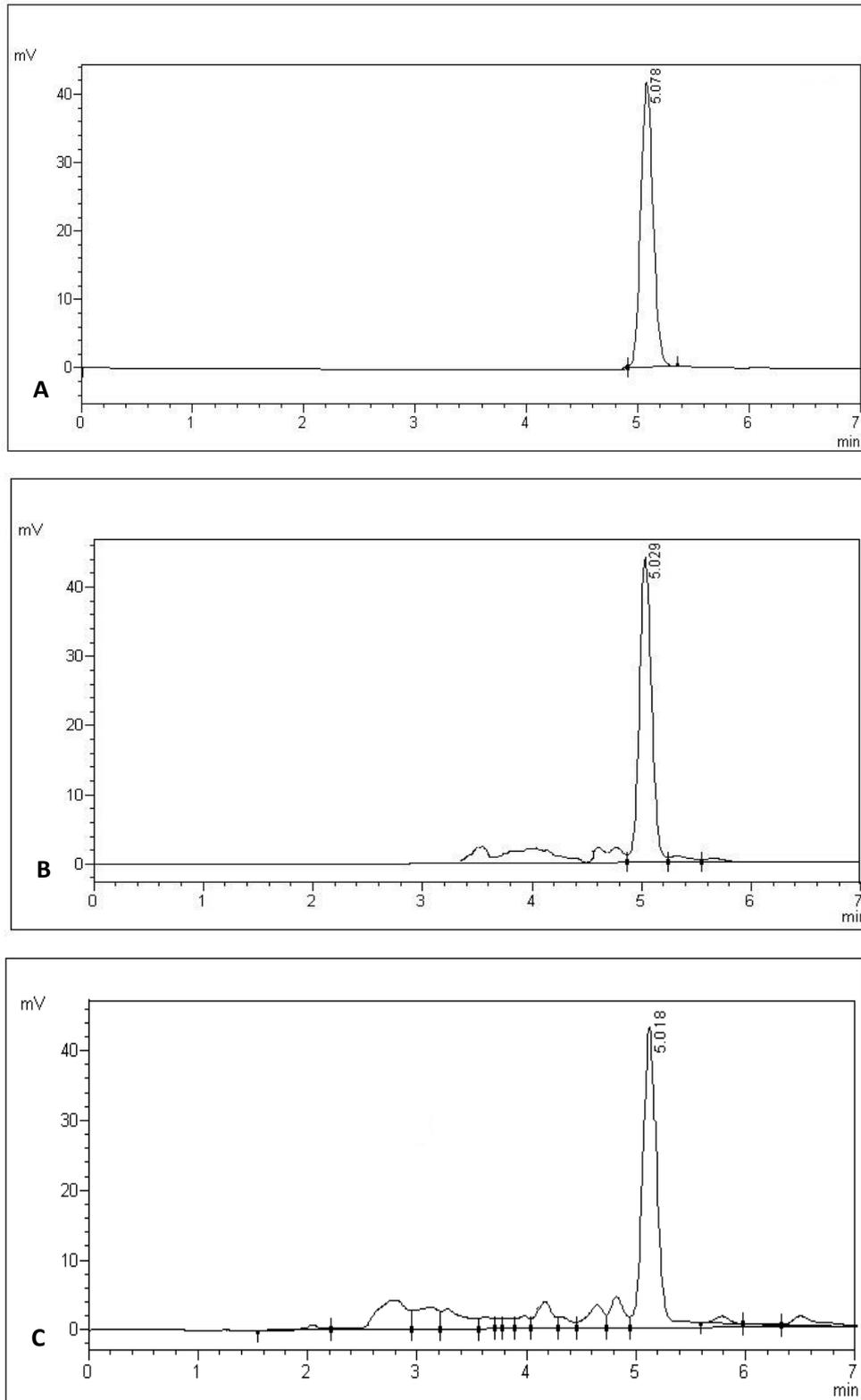


Figura 10 - Perfil cromatográfico do retinol em CLAE, com tempo de retenção de 5,0 minutos. (A) Pico do padrão de referência para retinol. (B) Pico de eluição de retinol em uma amostra de soro materno. (C) Pico de eluição de retinol em uma amostra de leite materno.

3.6.4. Linearidade, precisão e exatidão do método

A linearidade do método foi examinada através da construção de uma curva de calibração, utilizando padrão de retinol sintético diluído em diferentes concentrações: 3,2 ng/20µL; 6,4 ng/20µL; 12,8 ng/20µL; 25,5 ng/20µL; 51 ng/20µL e 102 ng/20µL. A equação da reta foi obtida por regressão linear (concentração do padrão de retinol *versus* área correspondente), sendo $R^2=0,9998$ (Figura 11).

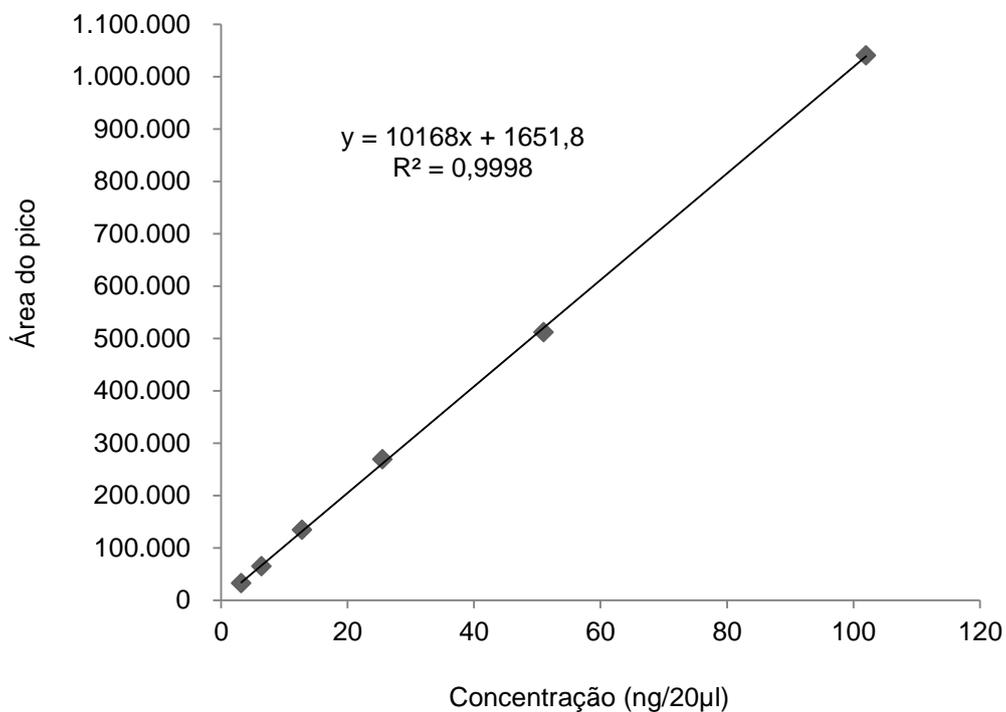


Figura 11 - Curva de calibração e equação da reta obtida através da aplicação em CLAE de diferentes concentrações do padrão de retinol.

Fonte: Elaborado pelo autor

A precisão foi analisada a partir do teste de repetitividade, tendo sido extraída uma mesma amostra em três dias alternados. O coeficiente de variação obtido foi abaixo de 4%.

A exatidão do método foi verificada por meio do teste de recuperação: foram analisados 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). As amostras foram extraídas em triplicata e aplicadas em CLAE, e a porcentagem de recuperação do retinol foi de 98%, demonstrando uma extração eficaz.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o software estatístico SPSS (versão 22.0 para Windows, SPSS Inc, Chicago, EUA). As concentrações de retinol nas amostras são apresentadas como média aritmética \pm desvio-padrão e foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da distribuição, que foi considerada normal se $p > 0,05$. Para verificar a homogeneidade entre as variâncias dos grupos foi feito o teste de homogeneidade da variância Levene.

As diferenças entre os grupos no que diz respeito às variáveis categóricas relacionadas às características maternas, do parto e dos neonatos foram testadas por meio do teste qui-quadrado.

As diferenças entre os grupos para as variáveis numéricas que apresentaram distribuição normal foram verificadas utilizando o teste *t* de Student para amostras independentes.

Para verificar diferenças entre os grupos para as variáveis numéricas com distribuição assimétrica, foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney.

Para verificar a variação do conteúdo de retinol entre as fases de lactação (leite colostro, de transição e maduro) foi utilizado o teste de Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas. Para examinar diferenças significativas entre essas médias par a par, foi utilizado o teste *Post Hoc* Bonferroni.

Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3.8. VALORES DE REFERÊNCIA

Foram considerados prematuros aqueles recém-nascidos com idade gestacional menor que 37 semanas de gestação (KILSZTAJN et al., 2003). A classificação do nível de prematuridade foi feita segundo a Organização Mundial da Saúde, dividindo-se o nascimento pré-termo em três subcategorias, de acordo com

as semanas de idade gestacional: extremamente pré-termo (< 28 semanas), muito pré-termo (de 28 a < 32 semanas) e pré-termo moderado a tardio (de 32 a <37 semanas) (WHO, 2012).

O ponto de corte utilizado para identificação de deficiência de vitamina A no soro das lactantes e recém-nascidos foi de 20,0 µg/dL (MACTIER; WEAVER, 2005). No leite maduro, níveis de retinol maiores do que 30 µg/dL foram considerados adequados (WEST, 2002).

A recomendação de ingestão de vitamina A considerada para os lactentes foi a AI proposta pelo *Institute of Medicine* (2001) (400 µg/dia).

Para o cálculo do fornecimento de vitamina A pelo leite, foi utilizada a estimativa de 500 mL como sendo o consumo médio diário de leite por recém-nascidos a termo na primeira semana de vida (ROSS, HARVEY, 2003). Para recém-nascidos pré-termo, foram considerados os volumes de 254 mL/dia na primeira semana (BAUER; GERSS, 2011) e 552 mL/dia no primeiro mês pós-parto (SOUZA et al., 2015).

4. RESULTADOS

Fizeram parte do estudo 182 mulheres com idade média de 26 anos, sendo 118 do GPT e 64 do GT. Verificou-se que as parturientes pré-termo possuíam um maior grau de escolaridade e renda familiar mais alta, em comparação às mães a termo (Tabela 1).

Tabela 1 - Características de parturientes a termo e pré-termo atendidas em duas maternidades públicas do Rio Grande do Norte, Brasil, 2014.

| Característica | Grupo | | |
|---|-------------------|--------------------|-------------------|
| | Termo | Pré-termo | P |
| Idade (anos) | 25,1 ± 6,6 (n=63) | 26,1 ± 6,5 (n=113) | 0,25 ^a |
| Escolaridade | n=60 | n=112 | 0,02 ^b |
| 0 a 8 anos | 20 (33%) | 27 (24%) | |
| 9 a 11 anos | 40 (67%) | 75 (67%) | |
| >11 anos | 0 (0%) | 10 (9%) | |
| Renda familiar | n=62 | n=112 | 0,01 ^b |
| ≤ 1 salário mínimo | 39 (63%) | 43 (38%) | |
| 1 a 3 salários mínimos | 22 (35%) | 57 (51%) | |
| >3 salários mínimos | 1 (2%) | 12 (11%) | |
| Nº de moradores na casa | n=61 | n=112 | 0,87 ^b |
| ≤ 4 pessoas | 44 (72%) | 78 (70%) | |
| > 4 pessoas | 17 (28%) | 34 (30%) | |
| Paridade | n=55 | n=90 | 0,00 ^b |
| Primípara | 16 (29%) | 52 (58%) | |
| Múltipara (≥ 2 filhos biológicos) | 39 (71%) | 38 (42%) | |
| Estado nutricional gestacional^c | n=60 | n=100 | 0,42 ^b |
| Baixo peso | 8 (13%) | 15 (15%) | |
| Normal | 20 (33%) | 32 (32%) | |
| Sobrepeso | 21 (35%) | 25 (25%) | |
| Obesidade | 11 (19%) | 28 (28%) | |

^a Teste U de Mann-Whitney. Diferenças consideradas significativas se $p < 0,05$.

^b Teste qui-quadrado. Diferenças consideradas significativas se $p < 0,05$.

^c ATALAH; CASTILLO; CASTRO, 1997.

Para a variável paridade, foi encontrado um maior percentual de primiparidade entre as mães de prematuros, ou seja, a maioria (58%) acabara de conceber o primeiro filho; enquanto no GT 71% eram múltiparas (Tabela 1). As categorias das variáveis escolaridade, renda e paridade, entretanto, não apresentaram diferenças entre si, no que diz respeito às concentrações de retinol no soro do cordão umbilical, soro materno e leite materno ($p>0,05$, dados não apresentados).

A análise do estado nutricional gestacional mostra uma porcentagem alta de peso inadequado (baixo peso, sobrepeso e obesidade), alcançando quase 70% em ambos os grupos (Tabela 1).

As idades gestacionais médias dos GPT e GT foram 33,5 (24,0 a 36,0) e 40,0 (37,0 a 42,0) semanas, respectivamente ($p=0,00$). Entre os prematuros, 5% ($n=6$) eram extremamente pré-termo (< 28 semanas), 15% ($n=18$) muito pré-termo (28 a < 32 semanas) e 80% ($n=94$) pré-termo moderado a tardio (32 a <37 semanas) (Tabela 2).

A via de parto predominante no GPT foi a cesárea e os recém-nascidos desse grupo tinham, em média, 43 centímetros e 2049 gramas ao nascer, sendo a maioria classificados como de baixo peso (< 2500 g). No GT, por sua vez, a via de parto predominante foi a vaginal, o comprimento médio foi 49 centímetros e o peso médio foi 3331 gramas ao nascimento, com a maioria dos neonatos (93%) apresentando peso adequado ao nascimento (Tabela 2).

Tabela 2 - Características de recém-nascidos a termo e pré-termo nascidos em duas maternidades públicas do Rio Grande do Norte, Brasil, 2014.

| Característica | Grupo | | p |
|---|--------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| | Termo | Pré-termo | |
| Idade gestacional (semanas) | 40,0 ± 1,3 ^a (n=64) | 33,5 ± 2,7 ^a (n=118) | 0,00 ^b |
| Tipo de parto | n=60 | n=114 | 0,00 ^c |
| Normal | 46 (77%) | 49 (43%) | |
| Cesárea | 14 (23%) | 65 (57%) | |
| Sexo do recém-nascido | n=50 | n=112 | 0,17 ^c |
| Masculino | 29 (58%) | 52 (46%) | |
| Feminino | 21 (42%) | 60 (54%) | |
| Comprimento ao nascer (cm) | 49,2 ± 1,9 ^a (n=59) | 43,0 ± 4,9 ^a (n=101) | 0,00 ^b |
| Peso ao nascer (g) | 3331 ± 582 ^a (n=60) | 2049 ± 667 ^a (n=112) | 0,00 ^b |
| Estado nutricional ao nascer^d | n=48 | n=112 | 0,00 ^c |
| Muito baixo peso (<1500 g) | 0 (0%) | 20 (18%) | |
| Baixo peso (1500-2500 g) | 0 (0%) | 66 (59%) | |
| Adequado (2500-4000 g) | 44 (92%) | 26 (23%) | |
| Macrossomia (>4000 g) | 4 (8%) | 0 (0%) | |

^a Média ± DP

^b Teste t de Student para amostras independentes. Diferença significativa se p<0,05.

^c Teste qui-quadrado. Diferenças consideradas significativas se p<0,05.

^d UNICEF, 2004

Os valores mostram que a concentração sérica materna de retinol foi significativamente maior no grupo pré-termo (p<0,01). Analisando os dados individualmente, foi visto que apenas uma parturiente deste grupo (1%) possuía concentrações indicativas de deficiência sérica, enquanto no grupo a termo essa porcentagem foi maior, com 8% das mulheres (n=5) apresentando valores de retinol no soro abaixo de 20 µg/dL (Tabela 3).

No soro do cordão umbilical, embora a média de retinol tenha sido menor nos prematuros, esta não diferiu estatisticamente dos recém-nascidos a termo (p>0,05). Quanto à porcentagem de inadequação, 43% (n=19) dos recém-nascidos tinham concentrações abaixo de 20 µg/dL no GPT, e 36% (n=23) no GT (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração de retinol ($\mu\text{g/dL}$) no soro do cordão umbilical e soro materno de parturientes a termo e pré-termo assistidas em duas maternidades públicas do Rio Grande do Norte, Brasil, 2014.

| | Retinol ($\mu\text{g/dL}$) ^a | | | | P |
|-----------------------|---|----------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|
| | Termo (n) | <20 $\mu\text{g/dL}$ | Pré-termo (n) | <20 $\mu\text{g/dL}$ | |
| Soro do cordão | 23,2 \pm 7,6 (64) | 36% | 20,4 \pm 7,4 (44) | 43% | 0,06 ^b |
| Soro materno | 42,8 \pm 16,3 (64) | 8% | 48,6 \pm 12,3 (106) | 1% | 0,00 ^c |

^a Média \pm DP

^b Teste t de Student para amostras independentes. Diferença significativa se $p < 0,05$.

^c Teste U de Mann-Whitney. Diferença significativa se $p < 0,05$.

No leite colostro, as mulheres que deram à luz a crianças prematuras apresentaram quantidade de retinol de $100,8 \pm 49,0 \mu\text{g/dL}$ ($n=106$), e no grupo termo a concentração foi de $127,5 \pm 65,1 \mu\text{g/dL}$ ($n=64$) ($p=0,02$) (Figura 12).

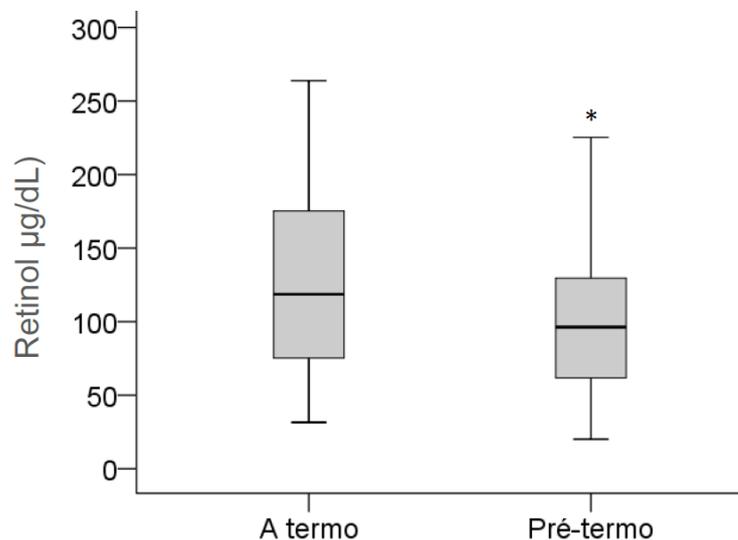


Figura 12 - Concentração de retinol ($\mu\text{g/dL}$) no leite colostro de parturientes a termo e pré-termo assistidas em duas maternidades públicas do Rio Grande do Norte, Brasil, 2014.

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Teste U de Mann-Whitney.

Ao longo das fases de lactação do grupo pré-termo, a concentração média da vitamina foi maior na fase de transição ($112,5 \pm 49,7 \mu\text{g/dL}$; $n=68$) e menor no leite maduro ($57,2 \pm 23,4 \mu\text{g/dL}$; $n=46$).

Foram encontradas diferenças significativas entre as médias de retinol das diferentes fases do leite de mulheres pré-termo, através do teste de Análise de Variância para medidas repetidas ($p<0,001$) e do teste *Post Hoc* Bonferroni ($p<0,05$) (Figura 13).

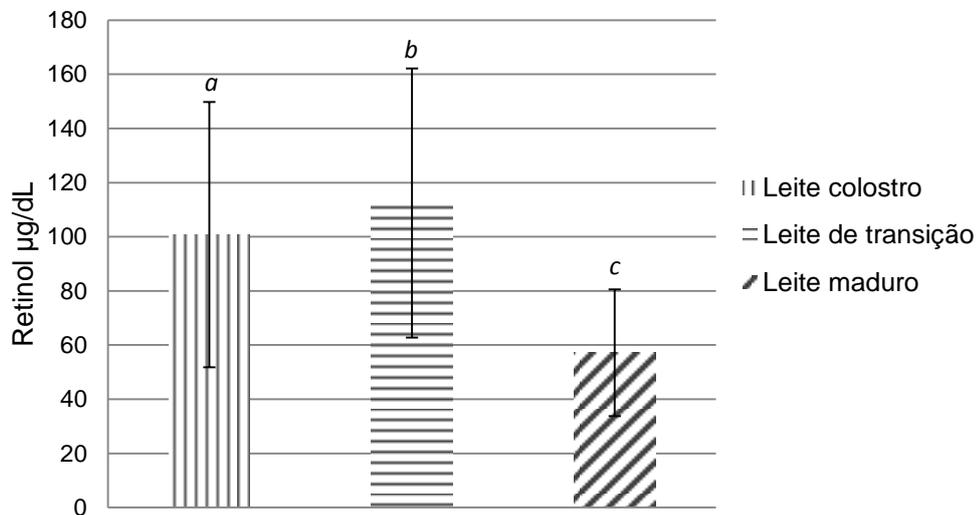


Figura 13 – Concentração de retinol ($\mu\text{g/dL}$) nos leites colostro ($n=106$), de transição ($n=68$) e maduro ($n=46$) de parturientes pré-termo.

a,b,c Diferenças estatisticamente significativas: $p<0,05$. Análise de Variância para medidas repetidas, *Post Hoc* Bonferroni.

Considerando os valores supracitados, o leite colostro do GT atingiu a recomendação de ingestão de vitamina A, fornecendo em média $638 \mu\text{g/dia}$. No GPT, entretanto, em nenhuma das fases o leite atingiu a recomendação, embora o fornecimento calculado tenha aumentado ao longo dessas fases ($256 \mu\text{g/dia}$, $286 \mu\text{g/dia}$ e $316 \mu\text{g/dia}$ nas fases de colostro, leite de transição e leite maduro, respectivamente) (Figura 14).

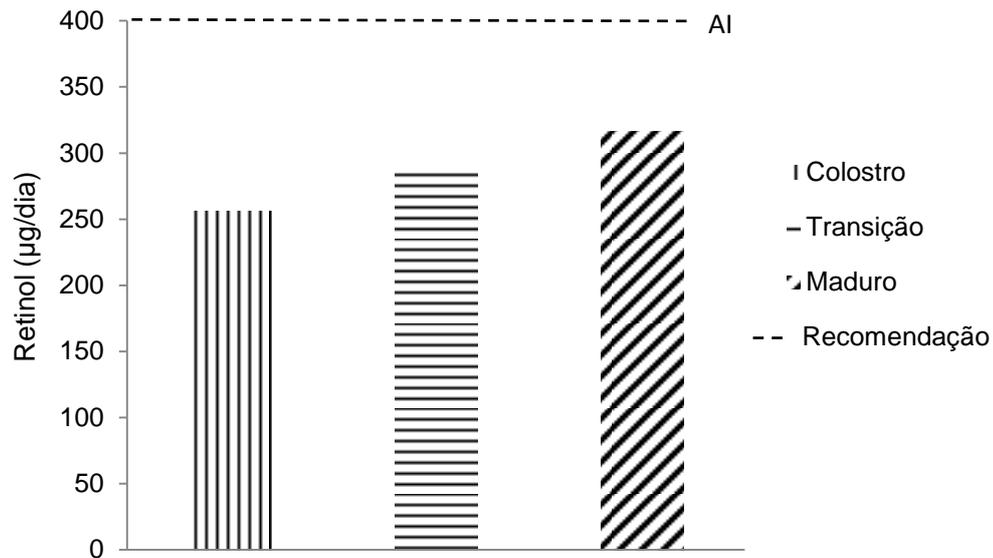


Figura 14 - Fornecimento de retinol ($\mu\text{g}/\text{dia}$) pelos leites colostro ($n=106$), de transição ($n=68$) e maduro ($n=46$) de parturientes pré-termo e comparação à recomendação de vitamina A para lactentes, segundo o *Institute of Medicine* (2001).

Em relação ao ponto de corte considerado para retinol no leite maduro no grupo pré-termo, 9% das mulheres ($n=4$) tinham concentrações consideradas inadequadas nessa fase ($<30 \mu\text{g}/\text{dL}$).

Houve uma correlação positiva entre as concentrações de retinol no soro materno e do cordão umbilical em ambos os grupos, sendo de grau forte no GT e moderado no GPT (Figura 16) (COHEN et al., 1988). O leite materno não se correlacionou com o soro materno nem com o soro do cordão umbilical ($p>0,05$, dados não apresentados).

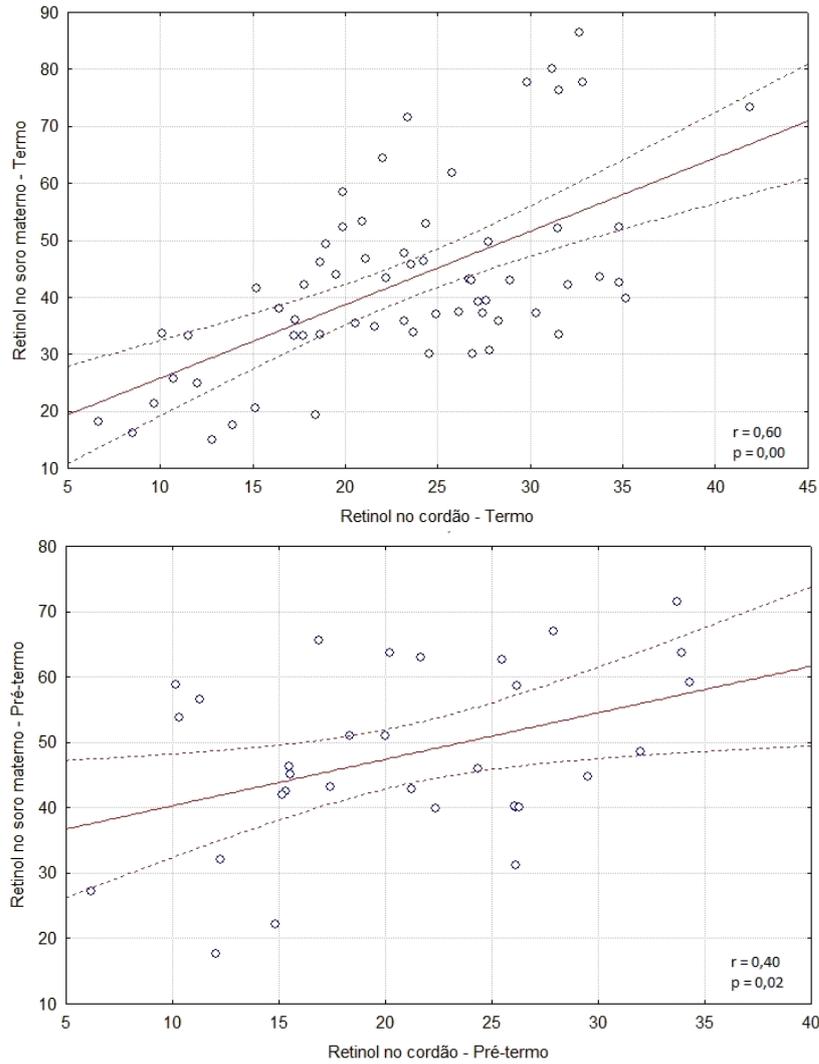


Figura 15 – Diagramas de dispersão mostrando as correlações entre os níveis de retinol no soro materno e do cordão umbilical ($\mu\text{g/dL}$) dos grupos termo, $n=64$ (A) e pré-termo, $n=32$ (B).

Teste de correlação r de *Pearson*. Resultados significativos se $p < 0,05$. Força da correlação: $0.10 < r < 0.29$ (fraca); $0.30 < r < 0.49$ (moderada); $0.50 < r < 1.00$ (forte) (COHEN, 1988).

5. DISCUSSÃO

Segundo uma pesquisa recente do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) sobre fatores de risco para prematuridade, a escolaridade materna associa-se positivamente aos nascimentos pré-termo, ou seja, maior número de nascimentos prematuros é verificado em grupos com maior escolaridade, como visto neste trabalho. Há, ainda, um maior risco de nascimento prematuro em gestantes primíparas, o que é condizente com os achados deste estudo (VICTORA, 2013).

Mais de 80% dos nascimentos prematuros no mundo ocorrem entre 32 e 37 semanas de gestação (WHO, 2012). Refletindo esse dado, 80% dos neonatos pré-termo que fizeram parte deste estudo estavam nessa fase da gestação (nascimento pré-termo moderado a tardio). Além disso, 77% dos recém-nascidos tinham peso ao nascer abaixo de 2500 g, considerado baixo peso, que é uma das consequências da prematuridade e contribui direta ou indiretamente para a maior parte das mortes neonatais (WHO, 2006).

Essencial para a sobrevivência desses recém-nascidos é o adequado suprimento de vitamina A e a principal forma de suprir os lactentes com essa vitamina na ausência de suplementação é o aleitamento materno. Portanto, o adequado estado nutricional da mãe é fator essencial para manter níveis satisfatórios do nutriente no leite (OMS, 2013a).

Neste estudo, observou-se que ambos os grupos de mulheres apresentavam média de retinol sérico acima do ponto de corte indicativo de deficiência (20 µg/dL). Pesquisas realizadas no Nordeste do Brasil que avaliaram o retinol no soro materno obtiveram concentrações semelhantes às observadas neste trabalho (RIBEIRO et al., 2010; DANTAS et al., 2011; LIRA et al., 2011; CARMINA et al., 2013; FERNANDES et al., 2014). Gazala et al. (2003) em Israel, Ramalho et al. (2006) e Gomes et al. (2009) no Rio de Janeiro e Orhon et al. (2009) na Turquia também encontraram valores semelhantes.

Ao comparar os grupos prematuro e a termo, entretanto, a concentração sérica materna da vitamina foi significativamente maior no primeiro. Analisando os dados individualmente, foi visto que apenas 1% das mulheres possuía concentrações indicativas de deficiência no GPT, enquanto no GT essa

porcentagem foi maior, com 8% das puérperas apresentando valores de retinol no soro abaixo de 20 µg/dL.

Alguns autores observaram maiores concentrações plasmáticas de retinol em mulheres no segundo trimestre gestacional, em relação às que estavam no último trimestre, indicando uma possível tendência ao decréscimo do retinol sérico à medida que a gestação se prolonga (AYAH et al., 2007, HORTON et al., 2013).

Em uma pesquisa na Etiópia, observou-se uma associação negativa entre o terceiro trimestre gestacional e o *status* de vitamina A materno, sendo a média de retinol sérico nesse período gestacional menor em relação aos dois trimestres anteriores, aparentemente devido a efeitos da hemodiluição que ocorre em gestantes. Esses autores verificaram uma redução de 22% na concentração sérica de retinol no terceiro trimestre e, por isso, sugerem a existência de pontos de corte específicos por trimestre para definição da deficiência de vitamina (GEBRESELASSIE et al., 2013).

A hemodiluição ocorre devido ao aumento do volume plasmático na gestação, que é necessário para suprir a demanda do sistema vascular do útero aumentado; para proteger mãe e feto dos efeitos da queda do débito cardíaco quando a mulher está na posição supina, que é mais acentuado no último trimestre; e também para evitar efeitos adversos para a mãe decorrentes das perdas sanguíneas no parto e puerpério (SOUZA; FILHO; FERREIRA, 2002).

O volume plasmático aumenta de forma progressiva durante a gestação, iniciando-se na 6ª semana, alcançando o pico próximo à 24ª semana e estabilizando-se em torno da 32ª ou 34ª semana. Considerando o total da gestação, há um aumento de cerca de 50%, variando de uma mulher para outra. Há uma correlação positiva entre a expansão desse volume e o número de gestações e tamanho do feto, ou seja, múltiparas e gestantes de fetos maiores apresentam incremento maior do volume plasmático em comparação a primíparas e gestantes com fetos pequenos. Portanto, a hemodiluição pode ser menos significativa em parturientes pré-termo, uma vez que os seus recém-nascidos apresentam menor peso e a primiparidade é mais presente nesse grupo (SOUZA; FILHO; FERREIRA, 2002).

Outra hipótese para as mães de recém-nascidos pré-termo apresentarem mais retinol no soro é que isso ocorra devido a uma menor transferência placentária de retinol no grupo pré-termo, uma vez que essa vitamina se acumula no feto

principalmente no terceiro trimestre gestacional (BAYDAS et al., 2002), podendo levar a uma redução dos níveis séricos maternos no final da gestação.

Contudo, estudos na Turquia, no Brasil e na Alemanha não encontraram diferenças significativas nos níveis de retinol sérico entre mulheres que deram à luz a recém-nascidos a termo e pré-termo (BAYDAS et al., 2002, LIRA et al., 2011; WEBER et al., 2014). Já um estudo indiano observou valores significativamente maiores no soro de mães a termo, em comparação com aquelas com menos de 37 semanas de gestação ($p < 0,001$) (AGARWAL et al., 2008).

Apesar dos níveis séricos maternos maiores em parturientes que deram à luz a recém-nascidos pré-termo, no soro dos recém-nascidos não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos dois grupos. Entretanto, analisando as concentrações séricas no cordão umbilical individualmente, foi verificado que no GPT havia uma maior porcentagem de recém-nascidos com valores séricos indicativos de deficiência (43%), em relação ao GT (36%). Resultados semelhantes foram observados por Chinyanga et al. (2005).

Adhikari et al. (2011) encontraram níveis de retinol plasmático no cordão de recém-nascidos pré-termo (16,41 $\mu\text{g/dL}$; $n=92$) significativamente menores que no de neonatos a termo (19,12 $\mu\text{g/dL}$; $n=62$) ($p < 0,001$). Os autores sugerem que a quantidade reduzida de RBPII encontrada em prematuros pode ser a razão dos menores níveis de vitamina A observados.

Agarwal et al. (2008) verificaram valores maiores de vitamina A plasmática no cordão umbilical com o aumento da idade gestacional, concluindo que a prematuridade está associada a baixos níveis neonatais da vitamina. Outros autores obtiveram resultados semelhantes, com concentrações significativamente maiores de retinol sérico nos bebês a termo, em comparação aos pré-termo ($p < 0,05$) (BAYDAS et al., 2002; HENRIKSEN et al., 2006).

Foi evidenciada uma correlação positiva entre as concentrações de retinol do soro do cordão umbilical e materno em ambos os grupos, o que também foi visto por outros autores (CHINYANGA et al., 2005; AGARWAL et al., 2008). Entretanto, a correlação foi mais forte entre o soro de cordão e o retinol materno no GT ($r=0,60$). Tal condição pode estar relacionada ao fato de que nos prematuros o soro do cordão umbilical apresentou 2,4 vezes menos retinol, em relação ao soro materno, enquanto no grupo a termo a concentração sérica nos neonatos foi 1,8 vezes mais

baixa que as das mães. Esses dados demonstram que na prematuridade a diferença entre os níveis séricos de retinol maternos e do neonato são maiores.

De acordo com Mactier e Weaver (2005), os recém-nascidos a termo recebem maiores quantidades de vitamina A durante a gestação e o leite humano contém vitamina A suficiente para manter o seu crescimento e desenvolvimento normais durante os seis primeiros meses de vida; no entanto, os recém-nascidos prematuros possuem estoques corporais inadequados da vitamina. Em adição, o neonato prematuro possui sistemas antioxidantes mais imaturos e é mais exposto ao estresse oxidativo do que crianças a termo, podendo implicar na deficiência de vitamina A neste grupo (BUONOCORE et al., 2002; PERRONE et al., 2007). Diante disso, uma concentração adequada desse micronutriente no leite materno é essencial para atender às necessidades do neonato e para formação de suas reservas hepáticas de vitamina A (AKOHOUE; GREEN, GREEN, 2005; AZEREDO; TRUGO, 2008).

No colostro, foi observada uma diferença significativa de retinol entre lactantes a termo e pré-termo ($p=0,02$), o que também foi encontrado por Dimenstein et al. (2010) e Melo et al. (2004) ao comparar o leite coletado nos primeiros dias pós-parto entre esses dois grupos.

Neste estudo, o leite colostro ofertado do GT foi capaz de suprir as necessidades nutricionais dos lactentes, considerando o consumo de 500 mL/dia nesse período. Entretanto, no GPT as concentrações de retinol no leite em todas as fases de lactação estavam abaixo da necessária para alcançar a ingestão recomendada de vitamina A, em razão do menor consumo de leite considerado.

Vale salientar que o consumo médio de leite varia entre os recém-nascidos nos primeiros dias pós-parto, principalmente de prematuros, uma vez que muitos não apresentam boa sucção e deglutição, entre outros complicadores (RIOS, 2007). Assim, as quantidades de vitamina A ingeridas são igualmente variáveis.

A partir da análise longitudinal do leite materno do grupo prematuro, foi observado que a concentração da vitamina no leite de transição pré-termo mostrou uma quantidade de retinol maior que a obtida em parturientes a termo na mesma fase de secreção láctea de outros estudos (MACIAS; SCHWEIGERT, 2001; SAKURAI et al., 2005). Entretanto, Vaisman, Mogilner e Sklan (1985) relataram maiores concentrações de retinol no leite de transição de lactantes a termo, em relação a um grupo pré-termo.

Destaca-se que no presente estudo foi observado um aumento na concentração de retinol na fase de transição do leite de prematuros, sendo significativamente maior se comparado ao colostro do mesmo grupo. No leite de parturientes a termo, esse aumento não é relatado na literatura, pois a tendência é a redução desse micronutriente no decorrer da lactação (MACIAS; SCHWEIGERT, 2001; SAKURAI et al., 2005; CAMPOS; PAIXÃO; FERRAZ, 2007; EZAKI et al., 2008; FUJITA et al., 2011).

Thomas et al. (1981), utilizando método colorimétrico, e Chappell, Francis e Clandinin (1985) também observaram um aumento na concentração de retinol no leite de transição secretado por mulheres com parto prematuro, ao contrário do grupo a termo, no qual a concentração foi maior no colostro. Esses resultados evidenciam um possível ajuste fisiológico do leite materno às maiores necessidades de retinol dos neonatos que nascem prematuramente. Os autores sugerem que isso pode ser decorrente de um maior estímulo para liberação dos estoques hepáticos maternos e transporte para a glândula mamária pela RBP e destacam que isso é vantajoso para esses recém-nascidos, cujo estoque hepático de vitamina A é baixo. Essa condição torna-se especialmente relevante ao se considerar a nutrição do recém-nascido prematuro que, por algum motivo, não tem acesso ao leite materno.

No leite maduro, o nível de retinol sofreu uma redução significativa em relação às fases iniciais, o que é normalmente observado no leite materno, que possui quantidades menores e mais estáveis de retinol após a fase de transição (MACIAS; SCHWEIGERT, 2001; EZAKI et al., 2008; BEZERRA et al., 2010; SZLAGATYS-SIDORKIEWICZ et al., 2012). Apesar disso, o fornecimento de vitamina A calculado aumentou nessa fase, devido ao maior volume de leite ingerido considerado.

Apesar da redução da concentração de retinol observada no leite maduro, a média neste estudo foi maior que a obtida no leite coletado no 30º dia pós-parto de mulheres a termo da mesma população (BEZERRA et al., 2010), o que pode indicar que em mães de prematuros essa redução é menos acentuada. Isso foi visto por Thomas et al. (1981), Chappell, Francis e Clandinin, (1985) e Vaisman, Mogilner e Sklan (1985), que compararam o leite materno a termo com o pré-termo longitudinalmente. Contudo, Souza et al. (2015) obtiveram quantidades de retinol no leite maduro coletado cerca de 30 dias após o parto de neonatos prematuros significativamente menores do que no seu grupo a termo.

As recomendações atuais da Organização Mundial da Saúde não indicam a suplementação com vitamina A para bebês com baixo peso ao nascer (<2500g) alimentados com leite humano, em razão da falta de evidências de benefícios (WHO, 2011). Assim, destaca-se ainda mais a essencialidade de alimentar esses neonatos com o leite materno de suas próprias mães, uma vez que essa secreção mostrou ter um perfil diferente do leite produzido por lactantes a termo. Além disso, é importante que o conteúdo de vitamina A de suplementos fortificantes e fórmulas lácteas destinados a esses recém-nascidos prevejam as maiores necessidades desse público-alvo.

Nesse contexto, é indispensável também a orientação nutricional da mulher durante o pré-natal e lactação para o consumo de alimentos fonte de vitamina A e a avaliação da necessidade do uso de suplementos contendo essa vitamina durante a gestação, uma vez que foi mostrada uma correlação positiva entre os níveis séricos maternos e do neonato e, em ambos os grupos, houve um alto percentual de deficiência sérica ao nascer.

Sugere-se o desenvolvimento de estudos longitudinais que avaliem os efeitos da suplementação materna com vitamina A no pós-parto em mulheres que deram à luz prematuramente. É sugerido, ainda, que sejam revistas as diretrizes de suplementação de mulheres no pós-parto imediato e bebês prematuros de baixo peso com vitamina A, visto que o leite materno não alcançou a recomendação de ingestão dietética para esses lactentes.

6. CONCLUSÕES

- As mulheres participantes do estudo tinham em média 26 anos de idade e aquelas do grupo pré-termo possuíam maior escolaridade e renda e um menor percentual de multiparidade, em relação ao grupo termo;
- Os neonatos prematuros nasceram com 33,5 semanas, em média, enquanto no grupo termo a idade gestacional média foi de 40,0 semanas. Neste último grupo, predominou a via de parto normal e o peso e comprimento ao nascer foram significativamente maiores que no pré-termo;
- Parturientes pré-termo apresentaram concentrações séricas de retinol maiores, comparadas às do grupo a termo, entretanto, isso não foi refletido no retinol sérico dos recém-nascidos, uma vez que os prematuros apresentaram menor concentração de retinol;
- O leite colostro de lactantes pré-termo mostrou uma concentração de retinol significativamente menor que o de lactantes a termo;
- Na fase de transição, o leite materno de mães de prematuros apresentou um aumento do conteúdo de retinol secretado, podendo contribuir mais para a formação das reservas hepáticas de retinol desses recém-nascidos;
- Na fase de leite maduro houve uma redução importante da concentração de retinol, embora o fornecimento dessa vitamina tenha aumentado devido ao maior do volume de leite ingerido pelo lactente;
- Em nenhuma das fases de secreção do leite no grupo pré-termo o fornecimento de retinol ao recém-nascido atingiu a recomendação de ingestão de vitamina A para lactentes.

REFERÊNCIAS

ADHIKARI, S. C. K. M. et al. Umbilical cord blood plasma vitamin A levels in low birth weight (LBW) babies. **Med. J. Armed Forces India**, v.67, n. 2 , p. 142-6, 2011.

AGARWAL, K et al. Factors affecting serum vitamin A levels in matched maternal-cord pairs. **Indian J. Pediatr.**, v.75, n. 5, p 443-6, 2008.

AJAYEOBA, A. I. Vitamin a deficiency in nigerian children. **Afr. J. Biomed. Res.**, v. 4, p. 107-10, 2001.

AKOHOUE, S. A.; GREEN, J. B.; GREEN, M. H. Dietary vitamin A has both chronic and acute effects on vitamin A indices in lactating rats and their offspring. **J. Nutr.**, [S.I.], v. 136, p.128-32, 2006.

AMBRÓSIO, C. L. B; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 19, n. 2, p 233-43, mar./abr., 2006.

ATALAH, S. E., CASTILLO, C. L., CASTRO, R. S. Propuesta de um nuevo estandar de evaluación nutricional en embarazadas. **Rev. Med. Chile.**, v. 125, p. 125:1429-36, 1997.

AULER, F.; DELPINO, F. S. Terapia nutricional em recém-nascidos prematuros. **Rev. Saúde e Pesq.**, v. 1, n. 2, p. 209-16, 2008.

AURVAG, A. K. et al. Improved vitamin A supplementation regimen for breastfed very low birth weight infants. **Acta Paediatr.**, v. 96, n.9, p. 1296–302, 2007.

AUSTENAA, L. M. I et al. Vitamin a status significantly alters nuclear factor-kb Activity assessed by in vivo imaging. **FASEB J**, v. 18, p. 1255-7. Epub 2004.

AYAH, R. A. et al. The effects of maternal and infants vitamin A supplementation on vitamin A status: a randomized trial in Kenya. **Br. J. Nutr.**, v. 98, p. 422-30, 2007.

AZAIS-BRAESCO, V.; PASCAL, G. Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 1325S–33S, 2000.

AZEREDO, V. B.; TRUGO, N. M. F. Retinol, carotenoids, and tocopherols in the milk of lactating adolescents and relationships with plasma concentrations. **Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 133-9, 2008.

BATTEN, M. L. et al. Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver, **J. Biol. Chem.**, v. 279, 10422-32, 2004.

BAUER, J.; GERSS, J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. **Clin. Nutr.**, v. 30, p. 215-20, 2011.

BAYDAS, G. et al. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. **Arch. Med. Res.**, v. 33, p. 276-80, 2002.

BELLOVINO, D. et al. Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP secretion. **Mol. Aspects Med.**, [S.I.], v. 24, p. 411-20, 2003.

BERTI, C. et al. Micronutrients in pregnancy: Current knowledge and unresolved questions. **Clin. Nutr.**, v. 30, p. 689-701, 2011.

BEZERRA, D. S. A randomized trial evaluating the effect of 2 regimens of maternal vitamin a supplementation on breast milk retinol levels. **J. Hum. Lact.**, v. 26, n. 2, p. 148-56, 2010.

BETTIOL, H.; BARBIERI, M. A.; SILVA, A. A. M. Epidemiologia do nascimento pré-termo: tendências atuais. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 32, p. 57-60, 2010.

BIESALSKI, H. K. et al. Biochemical but not clinical vitamin A deficiency results from mutations in the gene for retinol-binding protein. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, 931-36, 1999.

BLENCOWE, H., et al. National, regional and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends for selected countries since 1990: a systematic analysis. **Lancet**, v. 379, p. 2162-72, 2012.

BLOMHOFF, R.; BLOMHOFF, H. K. Overview of retinoid metabolism and function. **J. Neurobiol.**, v. 66, n. 7, p. 606-30, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 729/GM, de 13 de maio de 2005. Institui o Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, Seção 1, 14 maio 2005.

BUONOCORE, G. et al. Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. **Pediatr. Res.**, [S.l.], v. 52, p. 46–9, 2002.

CAMELO JR., J. S.; MARTINEZ, F. E. Lactoengenharia do leite humano. In: PEREIRA, G. R et al. **Nutrição do recém-nascido pré-termo**. Rio de Janeiro, RJ: MedBook. Cap. 2, p. 11-29.

CAMPOS, J. M.; PAIXÃO, J. A.; FERRAZ, C. Fat-soluble vitamins in human lactation. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 77, n. 5, p. 303-10, 2007.

CAPURRO, H. et al. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. **J. Pediatr.**, v. 93, n. 1, p. 120-2, 1978.

CARMINA, S. S., et al. The Effect of a maternal double megadose of vitamin a supplement on serum levels of retinol in children aged under six months. **J. Nutr. Metab.** 2013.

CHAGAS, M. H. C et al. Teratogenia da vitamina A. **Rev. Bras. Saúde Mater. Infant.**, Recife, v. 3, n. 3, jul./set. 2003.

CHAPPELL, J. E.; FRANCIS, T.; CLANDININ, M. T. Vitamina A and e content of human milk at early stages of lactation. **Early Hum. Dev.**, v. 11, p. 157-67, 1985.

CHECKLEY et al. Maternal Vitamin A supplementation and lung function in offspring. **N. Engl. J. Med.**, v. 362, n. 1, p. 1784-94, 2010.

CHINYANGA, E. A. et al. Vitamin A status of term and preterm infants delivered at Harare Central Hospital and fed exclusively on breast milk. **Cent. Afr. J. Med.**, v. 51, n 1-2, jan-feb, 2005.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. 2nd ed. Hillsdale, NJ: L. Erlbaum Associates; 1988.

CLAGETT-DAME, M.; KNUTSON, D. Vitamin A in reproduction and development. **Nutrients**, v. 3, p. 385-428, 2011.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3 ed. Barueri, SP: Manole, 2012.

DANTAS, J. C. O et al. Concentração sérica de retinol e prevalência de deficiência de vitamina A em puérperas. **RBPS**, v. 24, p. 40-45, jan./mar., 2011.

DEBIER, C.; LARONDELLE, Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. **Brit. J. Nutr.**, v. 93, p. 153-174, 2005.

DIMENSTEIN, R. et al. Influência da idade gestacional e da paridade sobre a concentração de retinol no colostro humano. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 60, n. 3, 2010.

DUESTER, G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis, **Cell**, v.134, p. 921–31, 2008.

EUCLYDES, M. P. Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação adequada. 2 ed. **Rev. Atual**: Viçosa, MG, 2000.

EZAKI, S. et al. Association between total antioxidant capacity in breast milk and postnatal age in days in premature infants. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, 42, 133–7, 2008

FAUL, F. et al. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behav. Res. Methods**, v. 39, p. 175-91, 2007.

FERNANDES, T. F. S. et al.. Serum retinol concentrations in mothers and newborns at delivery in a public maternity hospital in Recife, Northeast Brazil. **J. Health Popul. Nutr.**, v. 32, p. 28-35, 2014.

FUJITA, M. et al. Vitamin A Dynamics in Breastmilk and Liver Stores: A Life History Perspective. **Am. J. Hum. Biol.**, v. 23, p. 664–73, 2011.

GAZALA, E. et al. Retinol concentration in maternal and cord serum: its relation to birth weight in healthy mother-infant pairs. **Early Hum. Dev.**, v. 71, p. 19-28, 2003.

GEBRESELASSIE, S. G. Prevalence and correlates of prenatal vitamin a deficiency in Rural Sidama, Southern Ethiopia. **J. Health Popul. Nutr.**, v. 31, p. 185-94, 2013.

GERALDO, R. R. C. et al. Distribuição da hipovitaminose A no Brasil nas últimas quatro décadas: ingestão alimentar, sinais clínicos e dados bioquímicos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 16, p. 443-60, out./dez. 2003.

GIULIANO, A. R. et al. Simultaneous quantitation and separation of carotenoids and retinol in human milk by high-performance liquid chromatography. **Methods Enzimol.**, v. 213, p. 391-9, 1992.

GOLDBERG, I. J; ECKEL, R. H.; ABUMRAD, N. A. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways, **J. Lipid Res.**, v. 50, p. S86–90, 2009.

GOLDENBERG, R. L. et al. Epidemiology and causes of preterm birth. **Lancet** , v. 371, p. 75–84, 2008.

GOMES, M. M. et al. Serum vitamin A in mothers and newborns in the city of Rio de Janeiro. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 60, p. 282-92, 2009.

GRUNE, T. et al. β -Carotene is an important vitamin A source for humans. **J. Nutr.**, v. 140, n. 12, p. 2268S-85S, 2010.

HENRIKSEN, C. et al. Fat-soluble vitamins in breast-fed preterm and term infants. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 60, p. 756-62, 2006.

HORTON, D. K. Changes in the concentrations of biochemical indicators of diet and nutritional status of pregnant women across pregnancy trimesters in Trujillo, Peru, 2004–2005. **Nutr. J.**, v. 12, p. 80, 2013.

INSTITUTE OF MEDICINE. Vitamin A. **Food and Nutrition Board**: dietary references intake for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington (DC): National Academy Press, 2001. p. 82-161.

KAWAGUCHI, R. et al. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A, **Science**, v. 315, p. 820–5, 2007.

KILSZTAJN, S. et al. Assistência pré-natal, baixo peso e prematuridade no Estado de São Paulo, 2000. **Rev. Saúde Públ.**, v. 37, n. 3, p. 303-10, 2003.

KOSITAMONGKOL, S. et al. Vitamin A and E status in very low birth weight infants. **J. Perinatol.**, v. 31, p. 471–6, 2011.

LIRA, L. Q. et al. Correlation of vitamin A nutritional status on alpha-tocopherol in the colostrum of lactating women. **Matern. Child Nutr.**, v. 9, n. 1, p. 31-40, 2011.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-2010: an updated systematic analysis. **Lancet**, v. 379, p. 2151-61, 2012.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. **Lancet**, v. 385, p. 430–40, 2015.

MACIAS, C.; SCHWEIGERT, F. J. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin a, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 45, p. 82–5, 2001.

MACTIER, H.; WEAVER, L. T. Vitamin A and preterm infants: what we know, what we don't know, and what we need to know. **Arch. Dis. Child.**, v. 90, n. 2, p. F103-8, 2005.

MACTIER, H. Vitamin A for preterm infants; where are we now? **Semin. Fetal Neonatal Med.**, v. 18, p. 166-71, 2013.

MARQUES, R. F. S. V. et al. O crescimento de crianças alimentadas com leite materno exclusivo nos primeiros 6 meses de vida. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 2, p. 99-105, 2004.

MARTINS, M. C. et al. Panorama das ações de controle da deficiência de vitamina A no Brasil. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 5-18, jan./fev., 2007.

MCCOLLUM, E. V.; DAVIS, M. The necessity of certain lipins in the diet during growth. **J. Biol. Chem.**, v. 15, p. 167-75, 1913.

MELO, I. L. P.; BIBEIRO, K. D. S., DIMENSTEIN, R. Estudo das variações dos níveis de retinol no colostro humano de parturientes a termo e pré-termo. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v. 4, n. 3, p. 249-52, jul.-set., 2004.

MILNE, D. B.; BOTNEN, J. Retinol, α -tocoferol, lycopene and α - and β -carotene simultaneously determined in plasma by isocratic liquid chromatography. **Clin. Chem.**, [S.l.], v. 32, n. 5, p. 874-6, 1986.

NASCIMENTO, M. B. R.; ISSLER, H. Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.**, S. Paulo, v. 58, n. 1, p. 49-60, 2003.

O'BYRNE, S. M. et al. Multiple pathways ensure retinoid delivery to milk: studies in genetically modified mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 298, p. 862-70, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Diretriz: Suplementação de vitamina A em mulheres no pós-parto**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2013a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Diretriz: Suplementação neonatal de vitamina A**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2013b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Diretriz: Suplementação de vitamina A em bebês de 1-5 meses de vida**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2013c.

ORHON, F. S. The influence of maternal smoking on maternal and newborn oxidant and antioxidant status. **Eur. J. Pediatr.**, v. 168, p. 975-81, 2009.

ORTEGA, R. M. 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.**, v. 66, p. 564-8, 1997.

ORTEGA, R. M. et al. Influence of smoking on vitamin E status during the third trimester of pregnancy and on breast-milk tocopherol concentrations in Spanish women. **Am J Clin Nutr**, [S.l.], v. 68, p. 662-7, 1998.

OSBORNE, T. B. et al. The relation of growth to the chemical constituents of the diet. **J. Biol. Chem.**, v 326, p 311-26, 1913.

PERRONE, S. et al. Oxidative Stress and Nutrition in the Preterm Newborn. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 45, Suppl. 3, p. 178-182, 2007.

QUADRO, L. et al. Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. **Mol. Aspects Med.**, v. 24, p. 421–30, 2003.

QUEIROZ, S. S. **Proposta de atuação no combate à hipovitaminose A na comunidade.** Temas de nutrição em pediatria. Departamento de Nutrição, Sociedade Brasileira de Pediatria. Edição especial, 2001. p. 18-21.

QUILES, J. L. et al. Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. **Free Radic. Res.**, v. 40, n. 2, p. 199-206, 2006.

RAMALHO, R. A. et al. Associação entre deficiência de vitamina a e situação sociodemográfica de mães e recém-nascidos. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 52, p. 170-5, 2006.

RIBEIRO, K. D. S. et al. Nutritional vitamin A status in northeast Brazilian lactating Mothers. **J Hum. Nutr. Diet.**, v. 23, p. 154-61, 2010.

RIOS, I. J. A. **Mãe e bebê prematuro extremo:** possibilidade de vínculo em situação adversa. 2007. 85p. Dissertação (Mestrado em Fonoaudiologia) – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2007.

ROSS, A. C.; HARRISON, E. H. Vitamin A: nutritional aspects of retinoids and carotenoids. In: ZEMPLINI, J.; RUCKER, R. B.; MCCORMICK, D. B.; SUTTIE, J. W. (Ed.). **Handbook of vitamins.** 4. ed. [S.l.]: CRC Press, 2007. p.1-40.

ROSS, A.C.; PASATIEMPO, A.M.; GREEN, M.H. Chylomicron margination, lipolysis, and vitamin A uptake in the lactating rat mammary gland: implications for milk retinoid content. **Exp. Biol. Med.**, v. 229., p. 46-55, 2004.

ROSS, J. S.; HARVEY, P. W. J. Contribution of breastfeeding of vitamin A nutrition of infants: a simulation model. **Bull. World Health Organ.**, v. 81, p. 80-6, 2003.

SAIGAL, S.; DOYLE, L. W. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. **Lancet**, v. 371, p. 261–69, 2008.

SAKURAI, T. et al. Fat-Soluble and water-soluble vitamin contents of breast milk from Japanese women. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 51, p. 239-47, 2005.

SAPIN, V. et al. Esterification of vitamin A by the human placenta involves villous mesenchymal fibroblasts. **Pediatr. Res.**, v 48, p. 565–72, 2000.

SARNI, R. S. et al. Vitamina A: nível sérico e ingestão dietética em crianças e adolescentes com déficit estatural de causa não hormonal. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 48, n. 1, jan./mar. 2002.

SCHWEIGERT, F. J. et al. Effect of the stage of lactation in humans on carotenoid levels in milk, blood plasma and plasma lipoprotein fractions. **Eur. J. Nutr.**, v. 43, p. 39–44, 2004.

SOLOMONS, N. W. A. Vitamin A. In: BOWMAN, B. A.; RUSSEL, R. M. **Present Knowledge in Nutrition**. 10. ed. Washington: ILSI press, 2012. Cap. 11, p.149-84.

SOUZA, A. I.; FILHO, M. B.; FERREIRA, L. O. C. Alterações hematológicas na gravidez. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 24, p. 29-36, 2002.

SOUZA, G. et al. Vitamin A concentration in human milk and its relationship with liver reserve formation and compliance with the recommended daily intake of vitamin A in pre-term and term infants in exclusive breastfeeding. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 291, p. 319-25, 2015.

SPIEGLER, E. et al. Maternal-fetal transfer and metabolism of vitamin A and its precursor β -carotene in the developing tissues. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1821, p. 88-98, 2012.

STROBEL, M, TINZ, J., BIESALSKI, H. K. The importance of beta-carotene as a source of vitamin A with special regard to pregnant and breastfeeding women. **Eur. J. Nutr.**, v. 46 Suppl 1, p. 1-20, 2007.

SZLAGATYS-SIDORKIEWICZ, A. Longitudinal study of vitamins A, E and lipid oxidative damage in human milk throughout lactation. **Early Hum. Dev.** v. 88, p. 421–4, 2012.

THOMAS, M. R. et al. Vitamin A and vitamin E concentration of the milk from mothers of pre-term infants and milk of mothers of full term infants. **Acta Vitaminol. Enzymol.**, v. 3, p. 135-44, 1981.

TOKUSOGLU, O. et al. Retinol and α -tocopherol concentrations in breast milk of Turkish lactating mothers under different socio-economic status. **Int. J. Food Scienc. Nutr.**, v. 59, n. 2, p. 166-74, mar. 2008.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Low birthweight: country, regional and global estimates**. New York: UNICEF, 2004.

VAISMAN, N.; MOGILNER, B. M.; SKLAN, D. Vitamin A and E content of preterm and term milk. **Nutr. Res.**, v. 5, p. 931-5, 1985.

VICTORA, C. **Pesquisa para estimar a prevalência de nascimentos pré-termo no Brasil e explorar possíveis causas**. UNICEF BRASIL, 2013.

VITOLO, M. R. **Conceitos e parâmetros das recomendações de ingestão dietética (DRI)**. In: VITOLO, M. R. *Nutrição: da gestação ao envelhecimento*. Rio de Janeiro: Ed. Rubio, 2008.

WEBER, D. et al. Oxidative stress markers and micronutrients in maternal and cord blood in relation to neonatal outcome. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 68, p. 215–22, 2014.

WEST JR, K. P. Extent of vitamin A deficiency among preschool children and woman of reproductive age. **J. Nutr.**, [SI], v. 132, n. 9, p. 2857S-66S, 2002.

WOLF, R. Identification of a Membrane Receptor for Retinol-Binding Protein Functioning in the Cellular Uptake of Retinal. **Nutr. Rev.**, v. 65, p. 385-8, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Born too soon: the global action report on preterm birth**. Eds Howson CP, Kinney MV, Lawn JE. Geneva: World Health Organization, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Nutrition for Health and Development. Department of Child and Adolescent Health and Development. **The optimal duration of exclusive breastfeeding**: Report of the expert consultation. Geneva: World Health Organization, 2001.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on optimal feeding of low birthweight infants in low-and middle income.** Geneva: World Health Organization, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Optimal feeding of low-birth-weight infants: technical review.** Eds Edmond K, Bahl R. Geneva: World Health Organization, 2006.

YUYAMA, L. K. O. et al. Vitamina A (Retinol) e carotenóides. In: COZZOLINO, S. M. F.. **Biodisponibilidade de Nutrientes.** São Paulo: Ed. Manole, 2005. Cap. 8, p. 215-57.

APÊNDICE A - TCLE para maiores de idade



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Para maiores de idade

Esclarecimentos

Este é um convite para você participar da pesquisa: **Avaliação do estado nutricional em retinol de mães e recém-nascidos a termo e pré-termo**, que tem como pesquisador responsável o professor Roberto Dimenstein.

Esta pesquisa pretende avaliar o estado nutricional em vitamina A, também chamada de retinol, de mães e de recém-nascidos a termo (nascidos com 37 semanas ou mais de gestação) e prematuros (nascidos com menos de 37 semanas de gestação). Isso será feito através da dosagem da vitamina A no sangue da mãe, sangue do cordão umbilical e no leite materno.

O motivo que nos leva a fazer este estudo é a importância da vitamina A para a saúde do recém-nascido, principalmente prematuros, que possuem um risco mais alto de deficiência desta vitamina. Por isso, estudos que avaliem o estado nutricional em vitamina A de mães e recém-nascidos são necessários, para esclarecer se a quantidade dessa vitamina no leite e no sangue da mãe pode ter influência sobre a saúde do recém-nascido no período em que ele é amamentado.

Caso você decida participar, você deverá responder um questionário com perguntas socioeconômicas e sobre o seu pré-natal. Essas perguntas serão feitas no primeiro dia após o parto, demorando cerca de 10 minutos. Outras informações, sobre o parto, serão anotadas do seu prontuário e do prontuário do bebê. Sete dias e trinta dias depois do parto, você irá responder outros questionários, desta vez sobre sua alimentação e alimentação do bebê. O peso e comprimento do seu bebê serão anotados do prontuário ou medidos por um profissional capacitado. Você tem o direito de se recusar a responder perguntas que lhe causarem constrangimento.

Serão colhidas amostras do seu leite (2 mL, no 1º, 7º e 30º dia após o parto), sangue (5 mL, no 1º dia após o parto) e sangue do cordão umbilical (2 mL, que foi coletado no momento do parto e só será utilizado no estudo se você permitir). Essas amostras serão usadas para dosar a vitamina A e ficarão armazenadas por um ano no Laboratório de Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição, localizado no Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Após esse período, as amostras serão descartadas de modo seguro.

Durante a realização da coleta de sangue, a previsão de riscos é mínima, ou seja, o risco que você corre é semelhante àquele sentido num exame de rotina, relacionado à contaminação ou dor na região afetada. Esse risco e desconforto serão minimizados, pois a coleta desse material será realizada por profissionais treinados, usando materiais de proteção (máscara, luvas, agulhas e seringas descartáveis), e você terá como benefício a informação da quantidade de vitamina A presente no seu sangue e leite e no sangue do recém-nascido (cordão umbilical). Além disso, poderão ser dadas orientações nutricionais sobre sua alimentação e do seu bebê.

Em caso de algum problema que você possa ter, relacionado com a pesquisa, você terá direito a assistência gratuita que será prestada pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Durante todo o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas ligando para Mayara Santa Rosa Lima, nos telefones 9101-4034 ou 3215-3416 (ramal 205).

Você tem o direito de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo para você.

Os dados que você irá nos fornecer serão confidenciais e serão divulgados apenas em congressos ou publicações científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa lhe identificar.

Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável por essa pesquisa em local seguro e por um período de 5 anos.

Se você tiver algum gasto pela sua participação nessa pesquisa, ele será assumido pelo pesquisador e reembolsado para você.

Se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você será indenizado.

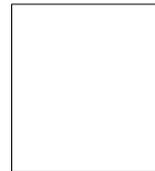
Qualquer dúvida sobre a ética dessa pesquisa você deverá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, telefone 3215-3135.

Este documento foi impresso em duas vias. Uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável Roberto Dimenstein.

Consentimento Livre e Esclarecido

Após ter sido esclarecido sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados nessa pesquisa, além de conhecer os riscos, desconfortos e benefícios que ela trará para mim e ter ficado ciente de todos os meus direitos, concordo em participar da pesquisa **Avaliação do estado nutricional em retinol de mães e recém-nascidos a termo e pré-termo**, e autorizo a divulgação das informações por mim fornecidas em congressos e/ou publicações científicas desde que nenhum dado possa me identificar.

Natal, ____ de _____ de 201__.



Impressão
datiloscópica do
participante

Assinatura do participante da pesquisa

Declaração do pesquisador responsável

Como pesquisador responsável pelo estudo **Avaliação do estado nutricional em retinol de mães e recém-nascidos a termo e pré-termo**, declaro que assumo a inteira responsabilidade de cumprir fielmente os procedimentos metodologicamente e direitos que foram esclarecidos e assegurados ao participante desse estudo, assim como manter sigilo e confidencialidade sobre a identidade do mesmo.

Declaro ainda estar ciente que na inobservância do compromisso ora assumido estarei infringindo as normas e diretrizes propostas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – CNS, que regulamenta as pesquisas envolvendo o ser humano.

Natal, ____ de _____ de 201__.

Roberto Dimenstein

Pesquisador responsável

APÊNDICE B - TCLE para menores de idade



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Para menores de idade

Esclarecimentos

Estamos solicitando a você a autorização para que o menor pelo qual você é responsável participe da pesquisa: **Avaliação do estado nutricional em retinol de mães e recém-nascidos a termo e pré-termo**, que tem como pesquisador responsável o professor Roberto Dimenstein.

Esta pesquisa pretende avaliar o estado nutricional em vitamina A, também chamada de retinol, de mães e de recém-nascidos a termo (nascidos com 37 semanas ou mais de gestação) e prematuros (nascidos com menos de 37 semanas de gestação). Isso será feito através da dosagem da vitamina A no sangue da mãe, sangue do cordão umbilical e no leite materno.

O motivo que nos leva a fazer este estudo é a importância da vitamina A para a saúde do recém-nascido, principalmente prematuros, que possuem um risco mais alto de deficiência desta vitamina. Por isso, estudos que avaliem o estado nutricional em vitamina A de mães e recém-nascidos são necessários, para esclarecer se a quantidade dessa vitamina no leite e no sangue da mãe pode ter influência sobre a saúde do recém-nascido no período em que ele é amamentado.

Caso você decida autorizar, serão colhidos dados sobre o parto e alimentação do recém-nascido no prontuário dele. Além disso, serão usados 2 mL de sangue do cordão umbilical, colhido durante o parto, para dosar a quantidade de vitamina A, pois esse sangue representa o sangue do bebê no momento do parto.

Durante a realização da coleta de sangue a previsão de riscos para o recém-nascido é mínima, ou seja, o risco que ele corre é semelhante àquele de um exame de rotina, referente a contaminação. Esse risco será minimizado, pois a coleta desse material será realizada por profissionais treinados, usando materiais de proteção (máscara, luvas, agulhas e seringas descartáveis). Esse estudo trará informações importantes para a ciência, ao esclarecer sobre o estado nutricional de mães e recém-nascidos a termo e pré-termo. Além disso, existe o benefício da informação da quantidade de vitamina A presente no sangue do recém-nascido (cordão umbilical), além de orientações nutricionais sobre amamentação. Essas informações serão dadas a você e beneficiarão a criança.

Em caso de algum problema que ele possa ter, relacionado com a pesquisa, ele terá direito a assistência gratuita que será prestada pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Durante todo o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas ligando para Mayara Santa Rosa Lima, nos telefones 9101-4034 ou 3215-3416 (ramal 205).

Você tem o direito de recusar sua autorização, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo para você e para o recém-nascido.

Os dados sobre ele serão confidenciais e serão divulgados apenas em congressos ou publicações científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa identificá-lo.

Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável por essa pesquisa em local seguro e por um período de 5 anos.

Se você tiver algum gasto pela participação do recém-nascido nessa pesquisa, ele será assumido pelo pesquisador e reembolsado para você.

Se ele sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, ele será indenizado.

Qualquer dúvida sobre a ética dessa pesquisa você deverá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, telefone 3215-3135.

Este documento foi impresso em duas vias. Uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável Roberto Dimenstein.

Consentimento Livre e Esclarecido

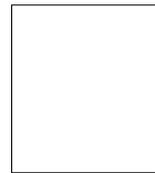
Eu, _____, representante legal do menor _____, autorizo sua participação na pesquisa **Avaliação do estado nutricional em retinol de mães e recém-nascidos a termo e pré-termo.**

Esta autorização foi concedida após os esclarecimentos que recebi sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados, por ter entendido os riscos, desconfortos e benefícios que essa pesquisa pode trazer para ele e também por ter compreendido todos os direitos que ele terá como participante e eu como seu representante legal.

Autorizo, ainda, a publicação das informações fornecidas por ele em congressos e/ou publicações científicas, desde que os dados apresentados não possam identificá-lo.

Natal, ____ de _____ de 201__.

Assinatura do representante legal



Impressão
datiloscópica do
participante

Declaração do pesquisador responsável

Como pesquisador responsável pelo estudo **Avaliação do estado nutricional em retinol de mães e recém-nascidos a termo e pré-termo**, declaro que assumo a inteira responsabilidade de cumprir fielmente os procedimentos metodologicamente e direitos que foram esclarecidos e assegurados ao participante desse estudo, assim como manter sigilo e confidencialidade sobre a identidade do mesmo.

Declaro ainda estar ciente que na inobservância do compromisso ora assumido estarei infringindo as normas e diretrizes propostas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – CNS, que regulamenta as pesquisas envolvendo o ser humano.

Natal, ____ de _____ de 201__.

Roberto Dimenstein
Pesquisador responsável

APÊNDICE C - Formulário de coleta de dados

| | | | |
|--|--|--|--|
| QUESTIONÁRIO DO PROJETO AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL EM RETINOL DE MÃES E RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMO | | | |
| Nº do prontuário: _____ Código da mãe: _____ | | | |
| Leito: _____ | | | |

| | | | |
|---------------------------------------|--|--|---------------------------|
| 001 | Número do questionário: | _____ | [] |
| 002 | Nome e código do entrevistador | _____ | [] |
| 003 | Data de aplicação do questionário | __/__/____ (dd/mm/aaaa) | __/__/__ (Dia/Mês/Ano) |
| CARACTERIZAÇÃO DA ENTREVISTADA | | | |
| 004 | Nome: | _____ | |
| | Nome da criança: | _____ | |
| 005 | Endereço: | _____ | |
| | Telefones: | _____ | |
| 006 | Qual sua idade em anos completos? | __ __ | [] |
| 007 | Atualmente qual seu estado civil? | 01. Solteira 02. Casada/ União estável 03. Divorciada 04. Viúva | [] |
| 008 | Qual seu nível de escolaridade? | 01. Analfabeta 02. Ensino Fundamental Incompleto 03. Ensino Fundamental Completo 04. Ensino Médio Incompleto 05. Ensino Médio Completo 06. Graduação Incompleta 07. Graduada 08. Pós-graduada 00. Não se aplica | [] |
| | Anos de escolaridade | _____ | [] |
| 009 | Qual sua ocupação? | 01. Trabalha _____ 02. Dona de casa 03. Não trabalha | [] |
| 010 | Número de moradores na casa? (incluindo o bebê) | __ __ | [] |
| 011 | Qual o rendimento mensal da sua família? (Devem ser somados todos os rendimentos das pessoas da família que moram na mesma casa) | 01. Sem renda 02. Até 1 salário mínimo (até R\$ 678,00) 03. De 1 a 3 salários mínimos (de R\$ 678,00 a R\$ 2.034,00) 04. De 3 a 5 salários mínimos (de R\$ 2.034,00 a R\$ 3.390,00) 05. De 5 a 7 salários mínimos (de R\$ 3.390,00 a R\$ 4.746,00) 06. De 7 a 10 salários mínimos (de R\$ 4.746,00 a R\$ 6.780,00) 07. De 10 a 20 salários mínimos (de R\$ 6.780,00 a 13.560,00) 08. Acima de 20 salários mínimos (acima de R\$ 13.560,00) 09. Não sabe 00. Não respondeu | [] |
| 012 | Utilizou algum medicamento, vitamina ou suplemento durante a gestação? Se sim, qual? | 01. Sim _____ 02. Não | [] |
| 013 | Amamentou durante a gestação? | 01. Sim 02. Não | [] |

| DADOS DO PRÉ-NATAL (ver cartão da gestante) | | | |
|--|---|--|----------|
| 014 | Qual a data da última menstruação (D.U.M)? | ____/____/____ (dia/mês/ano) | __/__/__ |
| 015 | Qual era seu peso pré-gestacional (antes de engravidar)? | _____ kg . 00. Não se aplica | [] |
| 016 | Qual a sua altura? | _____ m 00. Não se aplica | [] |
| 017 | Estado nutricional pré-gestacional: IMC = _____ | 01. Baixo peso (IMC<18,5 kg/m ²) 02. Normal (IMC 18,5 - 24,9 kg/m ²) 03. Sobrepeso (IMC 25 - 29,9 kg/m ²) 04. Obesidade (IMC ≥ 30,0kg/m ²) 00. Não se aplica | [] |
| 018 | Qual foi seu peso na última consulta da gestação? | _____ kg 00. Não se aplica Data da última consulta: __/__/__ | [] |
| 019 | Qual seu ganho de peso na gestação? (peso gestante final - peso pré-gestacional) _____ kg | 01. Adequado 02. Baixo 03. Alto 00. Não se aplica | [] |
| 020 | Qual a IG na última consulta da gestação? | _____ semanas 00. Não se aplica | [] |
| 021 | Estado nutricional gestacional: IMC = _____ | 01. Baixo peso 02. Normal 03. Sobrepeso 04. Obesidade 00. Não se aplica | [] |
| 022 | Número de consultas pré-natal | _____ | [] |
| 023 | Paridade (nº exato de partos) | _____ | [] |
| DADOS DO PARTO | | | |
| 024 | Data do parto/ Horário | __/__/__ (dd/mm/aaaa) __ h | __/__/__ |
| 025 | Tipo de parto | 01. Normal 02. Cesário 00. Não se aplica | [] |
| 026 | Sexo do Recém-nascido (RN) | 01. Masculino 02. Feminino | [] |
| 027 | Peso ao nascer do RN | _____ kg | [] |
| 028 | Comprimento nascer do RN | _____ cm | [] |
| 029 | Estado nutricional do RN | 01. <1500g muito baixo peso 02. 1500-2500g baixo peso 03. 2500-4000g adequado 04. >4000g Macrosomia | [] |
| 030 | Idade gestacional (capurro do bebê ou US) - prontuário do bebê | _____ sem | [] |
| 031 | Intercorrências da criança ao nascer | _____ _____ _____ | |

| 032 | Apgar 1 min | | [] |
|---------------|--|--|-----|
| 033 | Apgar 5 min | | [] |
| 034 | Apgar 10 min | | [] |
| DADOS DO BEBÊ | | | |
| 035 | Peso 7 dias | ____ kg | [] |
| 036 | Comprimento 7 dias | ____ cm | [] |
| 037 | Idade corrigida 7 dias | ____ sem | [] |
| 038 | Intercorrências da criança 7 dias | _____ _____ _____ | |
| 039 | Peso/idade RN 7d (Curva de Fenton) Z escore: ____ | 01. baixo peso para idade 02. peso adequado para idade 03. peso elevado para idade 00. Não se aplica | [] |
| 040 | Comprimento/idade RN 7d (Curva de Fenton) Z escore: ____ | 01. baixo comprimento para idade 02. comprimento adequado para idade 03. comprimento elevado para idade 00. Não se aplica | [] |
| 041 | Peso 30 dias | ____ kg | [] |
| 042 | Comprimento 30 dias | ____ cm | [] |
| 043 | Idade corrigida 30 dias | ____ sem | [] |
| 044 | Intercorrências da criança 30 dias | _____ _____ _____ | |
| 045 | Peso/idade RN 30d (Curva de Fenton) Z escore: ____ | 01. baixo peso para idade 02. peso adequado para idade 03. peso elevado para idade 00. Não se aplica | [] |
| 046 | Comprimento/idade RN 30d (Curva de Fenton) Z escore: ____ | 01. baixo comprimento para idade 02. comprimento adequado para idade 03. comprimento elevado para idade 00. Não se aplica | [] |

| ALIMENTAÇÃO DA CRIANÇA | | | |
|------------------------|---|--|-----|
| 047 | Alimentação infantil 0 dia _____ _____ _____ _____ | 01. Aleitamento materno exclusivo enteral 02. Nutrição parenteral 03. Aleitamento materno exclusivo oral 04. Aleitamento misto (oral e enteral) 05. Aleitamento materno (LM e outros leites) 06. Leite materno + suplementos 07. Fórmula infantil ou outro leite 08. Alimentação complementar 09. Dieta zero | [] |
| 048 | Alimentação infantil 7 dias _____ _____ _____ _____ | 01. Aleitamento materno exclusivo enteral 02. Nutrição parenteral 03. Aleitamento materno exclusivo oral 04. Aleitamento misto (oral e enteral) 05. Aleitamento materno (LM e outros leites) 06. Leite materno + suplementos 07. Fórmula infantil ou outro leite 08. Alimentação complementar 09. Dieta zero | [] |

| | | | |
|-----|---|--|-----|
| 049 | Alimentação infantil 30 dias _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ | 01. Aleitamento materno exclusivo enteral 02. Nutrição parenteral 03. Aleitamento materno exclusivo oral 04. Aleitamento misto (oral e enteral) 05. Aleitamento materno (LM e outros leites) 06. Leite materno + suplementos 07. Fórmula infantil ou outro leite 08. Alimentação complementar 09. Dieta zero | [] |
|-----|---|--|-----|

| | | |
|-----|---------------------------|--|
| 064 | Cordão umbilical (data/h) | Data da Coleta: __/__/____ Hora: __: __ |
| 065 | Sangue da mãe)h (data/h) | Data da Coleta: __/__/____ Hora: __: __ |
| 066 | Leite 0 h | Data da Coleta: __/__/____ Hora: __: __ |
| 067 | Leite 24 h | Data da Coleta: __/__/____ Hora: __: __ |
| 068 | Leite 7 dias | Data da Coleta: __/__/____ Hora: __: __ |
| 069 | Leite 30 dias | Data da Coleta: __/__/____ Hora: __: __ |

Data: _____ Assinatura do entrevistador: _____

Data: _____ Assinatura do entrevistador: _____