

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

CAROTENÓIDES E VITAMINA A EM COLOSTRO DE MÃES DE RECÉM NASCIDOS
PRETERMO, ATENDIDAS NO CAISM. CAMPINAS/SP

Paricez

Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida por Paula Andréa Liboni Passos e aprovada pela Comissão Julgadora em 17-12-93.

PAULA ANDRÉA LIBONI PASSOS

Nutricionista

PROFª DRA BERENICE CUNHA WILKE
Orientadora

PROF. DR. JAIME AMAYA-FARFAN
Co-orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre
em Ciência da Nutrição

1993

AGRACECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Berenice Cunha Wilke e ao Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan, pela orientação conjunta, amizade e apoio e pela flexibilidade com a qual se dispuseram a abrir espaço para um trabalho interdisciplinar.

Ao Prof. Dr. José Martins Filho, pelo apoio, disponibilidade, estímulo em momentos difíceis e pelas sugestões e críticas sensatas e construtivas.

À Prof^a. Dr^a. Helena Teixeira Godoy, pela disponibilidade técnica e pessoal, pela amizade e pelas esclarecedoras contribuições na escrita dessa dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Heloísa Mascia Cecchi, pelas sugestões, colaboração e atenção desde a etapa do exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Ademir Petenate, pela orientação nas análises estatísticas e pelo auxílio na compreensão do real significado dos resultados obtidos.

À Prof^a. Dr^a. Délia B. Rodriguez-Amaya, pela prestimosa contribuição na escrita dessa dissertação e pela viabilização técnica desse estudo, através do empréstimo do cromatógrafo líquido de alta eficiência, da doação dos padrões de carotenóides e do acesso ao Laboratório de Análises de Alimentos.

À Prof^a. Dr^a. Débora de Queiroz Tavares, pelo estímulo e pelo auxílio no estudo citológico.

Ao Prof. Dr. Lincoln de Camargo Neves Filho, da FEA, e ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, do Hemocentro da UNICAMP, pelo auxílio na armazenagem das amostras.

Às divisões de Neonatologia e de Obstetrícia do CAISM, pela permissão para a realização desse estudo.

Ao pessoal de enfermagem dos Serviços de Neonatologia e de Obstetrícia do CAISM, pela cooperação e pelo auxílio na coleta das amostras.

Aos funcionários do DEPAN, da Ciências, do Microcentro e das bibliotecas da FEA e da FCM, pela cooperação e auxílio nas diversas etapas desse trabalho.

À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos (ABIA) pelo fornecimento das cópias xerográficas necessárias à apresentação desse trabalho.

A Andréa, companheira e irmã, cuja amizade e estímulo foram fundamentais em mais essa etapa.

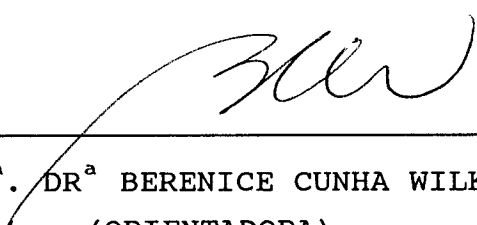
A Lu, Flávio e Gu que, mesmo de longe, me impulsionaram com sua torcida e confiança.

A Semiramis, Hilda, Normandis, Zezé, Lízia, Cecílias (Piauí e Rio), Marie, Mabel, Ivan, Célia, Elaine e Erna (novas e antigas amizades), que compartilharam das alegrias e tristezas, conquistas e frustrações decorrentes desse trabalho.

Aos colegas de pós-graduação da FEA, companheiros no ideal de pesquisar, aprender e crescer solidariamente.

E, finalmente, às mães, pela receptividade, colaboração e disponibilidade em participar desse estudo.

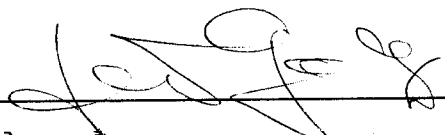
BANCA EXAMINADORA



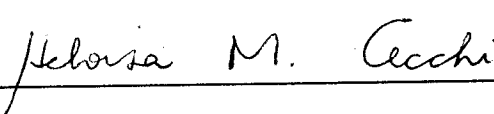
PROF^a. DR^a BERENICE CUNHA WILKE
(ORIENTADORA)



PROF. DR. JOSÉ MARTINS FILHO
(MEMBRO)



PROF^a. DR^a HELENA TEIXEIRA GODOY
(MEMBRO)



PROF^a DR^a HELOISA MASCIA CECCHI
(MEMBRO)

Campinas, 17 de dezembro de 1993

Ao meu Luiz,
companherismo, presença, força e doçura.

Aos meus pais, Ayrton e Tereza Inêz,
amor incondicional e estímulo constante.

dedico

AGRACECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Berenice Cunha Wilke e ao Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan, pela orientação conjunta, amizade e apoio e pela flexibilidade com a qual se dispuseram a abrir espaço para um trabalho interdisciplinar.

Ao Prof. Dr. José Martins Filho, pelo apoio, disponibilidade, estímulo em momentos difíceis e pelas sugestões e críticas sensatas e construtivas.

À Prof^a. Dr^a. Helena Teixeira Godoy, pela disponibilidade técnica e pessoal, pela amizade e pelas esclarecedoras contribuições na escrita dessa dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Heloísa Mascia Cecchi, pelas sugestões, colaboração e atenção desde a etapa do exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Ademir Petenate, pela orientação nas análises estatísticas e pelo auxílio na compreensão do real significado dos resultados obtidos.

À Prof^a. Dr^a. Délia B. Rodriguez-Amaya, pela prestimosa contribuição na escrita dessa dissertação e pela viabilização técnica desse estudo, através do empréstimo do cromatógrafo líquido de alta eficiência, da doação dos padrões de carotenóides e do acesso ao Laboratório de Análises de Alimentos.

À Prof^a. Dr^a. Débora de Queiroz Tavares, pelo estímulo e pelo auxílio no estudo citológico.

Ao Prof. Dr. Lincoln de Camargo Neves Filho, da FEA, e ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, do Hemocentro da UNICAMP, pelo auxílio na armazenagem das amostras.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS E QUADROS.....	iv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
2.1 Vitamina A e Carotenóides em Nutrição Humana.....	05
2.1.1. Caracterização Química.....	05
2.1.2. Fontes Dietéticas.....	08
2.1.3. Metabolismo.....	08
2.1.3.1. Metabolismo Geral.....	08
2.1.3.2. Transferência Materna de Vitamina A e Carotenóides.....	10
2.1.3.2.1. Transferência materno-fetal.....	10
2.1.3.2.2. Transferência materno-infantil.....	12
2.1.4. Funções.....	13
2.1.4.1. Vitamina A.....	13
2.1.4.1. Carotenóides.....	16
2.1.5. Recomendações Dietéticas.....	18
2.1.6. Métodos de Avaliação do Estado Nutricional de Vitamina A e Carotenóides.....	20
2.1.6.1. Vitamina A.....	20
2.1.6.2. Carotenóides.....	23
2.2. Dosagem de retinol e carotenóides nos fluidos corporais.....	24
2.2.1. Dosagem de retinol no soro e no leite materno.....	24
2.2.2. Dosagem de carotenóides em leite materno.....	26
2.3. Recém Nascido Pretermo, Vitamina A e Carotenóides.....	27

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Amostragem.....	32
3.2. Coleta de Material.....	33
3.3. Técnicas Empregadas.....	34
3.3.1. Análise de Retinol e Carotenóides no Colostro por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	34
3.3.2. Análise de Retinol no Soro por CLAE.....	36
3.3.3. Teste de Impressão Citológica da Conjuntiva Ocular (ICCO).....	37
3.3.4. Inquérito Nutricional.....	37
3.3.5. Análise estatística dos dados.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Amostra.....	40
4.2. Avaliação dos teores de vitamina A e carotenóides.....	43
4.2.1. Dieta.....	43
4.2.2. Soro.....	43
4.2.3. Colostro.....	46
4.3. Impressão citológica da conjuntiva ocular (ICCO).....	60
4.4. Correlações.....	60
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Caracterização do grupo de 10 mães de recém nascidos pretermo atendidas no CAISM fev./maio, 1992.....	41
TABELA 2: Caracterização do grupo de recém nascidos pretermo (RNPT) internados no Serviço de Neonatologia do CAISM fev./maio, 1992.....	42
TABELA 3: Consumo estimado de vitamina A (VA), em equivalentes de retinol/dia (ER/dia) das 10 gestantes estudadas, avaliado através de questionário de frequência alimentar.....	44
TABELA 4: Teores de vitamina A (VA) no soro, na dieta e no colostro das 10 mães de RNPT.....	45
TABELA 5: Comparação do teor de retinol sérico, de quatro das mães estudadas, coletado em diferentes períodos....	48
TABELA 6: Teores de retinol e carotenóides ($\mu\text{g/dL}$) do colostro das 10 mães de RNPT.....	49
TABELA 7: Composição do colostro e do leite de 4 mães com relação a retinol, licopeno, β -criptoxantina e β -caroteno ($\mu\text{g/dL}$).....	53
TABELA 8: Comparação dos teores de retinol e de carotenóides ($\mu\text{g/dL}$) dosados em colostro por cromatografia líquida de alta eficiência.....	64
TABELA 9: Comparação dos teores de retinol e carotenóides ($\mu\text{g/dL}$) dosados em leite maduro por cromatografia líquida de alta eficiência.....	64

ÍNDICE DE QUADROS E FIGURAS

QUADRO 01:	Técnicas mais utilizadas para a dosagem de retinol...	25
FIGURA 01:	Estrutura do retinol.....	05
FIGURA 02:	Estrutura de alguns carotenóides.....	07
FIGURA 03:	Cromatograma, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, típico do retinol (A) e acetato de retinila -padrão interno (B) para uma amostra de - soro.....	47
FIGURA 04:	Cromatograma, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, típico do retinol (A) e acetato de retinila -padrão interno (B) para uma amostra de colostro.....	50
FIGURA 05:	Cromatograma, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, típico para Sudan I-padrão interno (A), β -criptoxantina (B), licopeno (C), α -caroteno (D) e β -caroteno (E) em colostro.....	52
FIGURA 06:	Curva de calibração para retinol utilizando acetato de retinila como padrão interno (soro).....	54
FIGURA 07:	Curva de calibração para retinol utilizando acetato de retinila como padrão interno (colostro).....	55
FIGURA 08:	Curva de calibração para β -criptoxantina utilizando Sudan I como padrão interno (colostro).....	56
FIGURA 09:	Curva de calibração para licopeno utilizando Sudan I como padrão interno (colostro).....	57
FIGURA 10:	Curva de calibração para α -caroteno utilizando Sudan I como padrão interno (colostro).....	58
FIGURA 11:	Curva de calibração para β -caroteno utilizando Sudan I como padrão interno (colostro).....	59

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Ficha de dados gerais da puérpera e do neonato.....	92
ANEXO 2: Questionário de Frequência Alimentar.....	93

RESUMO

A vitamina A é essencial ao adequado crescimento e desenvolvimento fetal e infantil atuando na diferenciação e manutenção epitelial, em mecanismos de resposta imune e em várias outras funções sistêmicas. Os carotenóides, além de atuarem como pró-vitamina A, também atuam na resposta imune e são importantes antioxidantes naturais.

Apesar da importância desses nutrientes para o neonato, particularmente para o prematuro, há poucos estudos na caracterização do leite materno com relação aos carotenóides, que possam auxiliar na elucidação dos mecanismos de transferência de vitamina A e de carotenóides do sangue para o leite materno, assim como dos fatores intervenientes neste processo.

Esse estudo tem como objetivos a avaliação do estado nutricional em vitamina A de mães de recém nascidos pretermo e a composição do colostro destas mães com relação ao conteúdo de vitamina A e de carotenóides. O estado nutricional foi avaliado através de : 1- dosagem do retinol sérico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), 2- estimativa do consumo de vitamina A através de aplicação de inquérito seletivo de frequência alimentar, 3- exame citológico pelo teste de impressão citológica da conjuntiva ocular (ICCO). O teor sérico médio de retinol das 10 mães estudadas foi de $23 \pm 8 \mu\text{g/dL}$. O consumo estimado de vitamina A foi de $(781 \pm 247 \text{ ER/dia})$ e não foram registrados exames positivos para o teste de ICCO. Não foi, portanto, caracterizada carência de vitamina A no grupo pelos critérios do International Vitamin A Consultative Group (IVACG).

Foram identificados e quantificados, através de CLAE, os principais carotenóides do colostro quais sejam: β -criptoxantina, α e β -caroteno (carotenóides precursores de vitamina A) e licopeno (antioxidante importante). Os teores médios obtidos foram de 8 ± 14

$\mu\text{g/dL}$. para β -criptoxantina, $12 \pm 12 \mu\text{g/dL}$ para licopeno e $6 \pm 4 \mu\text{g/dL}$ para β -caroteno. O α -caroteno apresentou-se em menor quantidade em todos os colostros, tendo sido quantificado apenas em duas amostras com concentração de $3 \mu\text{g/dL}$. O retinol, também determinado por CLAE, apresentou teor médio de $71 \pm 43 \mu\text{g/dL}$.

Nas condições deste estudo, não foi encontrada correlação ($p < 0,05$) entre as taxas de retinol no soro ou no colostro, assim como entre o consumo estimado vitamina A e os mesmos teores.

ABSTRACT

Vitamin A is essential for the growth and development of both the fetus and the neonate with regard to cell differentiation, tissue maintenance, immune response and various other systemic functions. Carotenoids, in turn, have a critical role as provitamin A source, antioxidants and enhancers of the immune system.

In spite of the recognized importance of these nutrients for the neonate and the premature, in particular, there are few studies characterizing human milk in terms of carotenoids and which could serve in the elucidation of the mechanisms of both vitamin A and carotenoids transfer from the blood stream to the milk, as well as other phenomena underlying this process.

The present study is an evaluation of the vitamin A nutritional status of ten Brazilian mothers of preterm neonate and assessment of colostrum in terms of vitamin A and selected carotenoids. The nutritional status was ascertained through 1. serum retinol determination by high performance liquid chromatography (HPLC) 2. estimative of vitamin A intake by a selective nutrient questionnaire and 3. cytology by the conjunctival impression cytology technique (CIC). The average serum retinol level observed was $23 \pm 8 \mu\text{g/dL}$. The average daily intake of vitamin A among the mothers was $781 \pm 247 \text{ RE}$ and no positive cases were found by CIC test, thus no deficiency could be detected according to the criteria of the International Vitamin A Consultative Group (IVACG).

The principal carotenoids. β -cryptoxanthin, α and β -carotene (vitamin A precursors) and lycopene (chief antioxidant), were identified and quantified by HPLC in the colostrum (mean values 8 ± 14 , 12 ± 12 , $6 \pm 4 \mu\text{g/dL}$ for β -cryptoxanthin, lycopene and β -carotene, respectively). α -carotene was present in measurable levels in only two of the samples (average of $3 \mu\text{g/dL}$). Average retinol in the colostrum

was $71 \pm 43 \mu\text{g/dL}$.

Under the conditions of the study, no significant correlation ($P < 0,05$) was found between vitamin A intake and levels of this nutrient in either the serum or colostrum.

1-INTRODUÇÃO

A vitamina A apresenta ampla gama de funções. Ela é indispensável na diferenciação, crescimento e manutenção tecidual, atua no sistema imunitário do organismo (DE LUCA *et al.*, 1977) e, atualmente, são reconhecidos seus efeitos inclusive na morbi-mortalidade infantil (SOMMER *et al.*, 1983; BLOEM *et al.*, 1990). Alguns carotenóides atuam como precursores de vitamina A, no entanto, outras funções têm sido também atribuídas aos carotenóides como propriedade antioxidante. Eles atuariam contribuindo para a inibição de processos de oxidação tecidual (BURTON, 1989), protegendo a integridade das membranas e favorecendo a implementação dos processos de resposta imune do organismo, através do sequestro de oxigênio singlet e radicais livres (BENDICH & OLSON, 1989).

O suprimento das necessidades vitamínicas é essencial ao adequado crescimento infantil e é particularmente importante para os recém nascidos. Dentre os recém nascidos, os prematuros merecem atenção especial, visto que o depósito de vitaminas lipossolúveis nos tecidos fetais ocorre principalmente no terceiro trimestre da gravidez (ORZALEST & COLARIZI, 1982). Em função da interrupção precoce da gestação, os recém-nascidos pretermo (RNPT) apresentam menores taxas séricas (BRANDT *et al.*, 1978; SHENAI *et al.*, 1981) e menores estoques hepáticos (SHAH *et al.*, 1987) de vitamina A do que os a termo. Além disto, os RNPT apresentam crescimento pós-natal mais acelerado, são mais predispostos a situações de estresse como infecções e complicações respiratórias e são submetidos mais frequentemente a

intervenções tipo foto e oxigenoterapia (ORZALEST & COLARIZI, 1982). Estas condições acarretam maior demanda de vitaminas que, como a vitamina A e os carotenóides, atuem na diferenciação tecidual, na resposta imune ou possuam propriedade antioxidante. Através da avaliação do tecido hepático, de autópsia de crianças com diferentes idades, constatou-se que a maior parte da vitamina A é armazenada (no fígado) no período pós-natal, mesmo em condições de aparente adequação do suprimento desse nutriente durante a gestação (GEBRE-MEDHIN & VAHLQUIST, 1984). É fundamental, portanto, o adequado suprimento desse nutriente ao neonato, principalmente ao RNPT, evitando-se a instalação da deficiência de vitamina A.

O leite materno (principalmente o colostro) é uma fonte importante de vitamina A e de carotenóides e é o alimento infantil por excelência, sendo a forma mais apropriada para o suprimento das necessidades do neonato. A recomendação de nutrientes para os recém nascidos é baseada na composição do leite materno e no volume médio ingerido pelas crianças (OLSON, 1987), o que reforça a importância do conhecimento da composição deste alimento e dos fatores que nela possam influenciar.

Não há estudos brasileiros avaliando os teores de vitamina A e carotenóides no leite materno. No contexto internacional são poucos os estudos com dosagens de carotenóides no leite materno e, na maioria deles, foram empregadas técnicas que permitem apenas a quantificação de carotenóides totais (designação genérica que engloba diferentes carotenóides), o que limita a interpretação dos resultados. Em relação às dosagens de retinol deve-se questionar também as metodologias utilizadas, face às opções técnicas atuais que possibilitam a obtenção de resultados mais exatos. Dentre as técnicas disponíveis, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é, atualmente, a técnica recomendada para dosagem de vitamina A e carotenóides nos fluidos corporais em função da maior precisão, sensibilidade e rapidez na dosagem destes nutrientes (ARROYAVE et al., 1982). Para este

estudo, em particular, é também vantajosa e fundamental a utilização de pequenos volumes, permitida utilizando-se CLAE.

O processo de transferência da vitamina A para o leite materno ainda não está bem elucidado, assim como não estão bem estabelecidos os fatores que influenciam a composição do leite materno em vitamina A e carotenóides. O papel do estado nutricional materno em vitamina A e carotenóides no teor destes nutrientes no leite tem sido objeto de estudo e os resultados até então obtidos são controversos. No Brasil, são escassas e pouco significativas as informações a respeito do estado nutricional em vitamina A de gestantes e nutrizes (KELNER, 1969; BATISTA FILHO *et al.*, 1973; RONCADA & SZARFAC, 1975) e nenhum dos estudos avalia a relação deste estado com a composição do leite em vitamina A. O comitê internacional sobre vitamina A (International Vitamin A Consultative Group - IVACG) recomenda a realização de mais estudos sobre a composição do leite materno, os passos metabólicos envolvidos na transferência de vitamina A e carotenóides para este alimento e os fatores intervenientes neste processo (ARROYAVE *et al.*, 1982).

Sendo assim, para este estudo foram definidos os seguintes objetivos:

1- a dosagem de vitamina A e dos carotenóides α e β -caroteno, β -criptoxantina e licopeno no colostro de mães de RNPT.

2- a avaliação do estado nutricional das mesmas mães com relação a vitamina A.

Para que os objetivos propostos pudessem ser atingidos, foi necessário:

1. a seleção de procedimento para dosagem de vitamina A e

carotenóides em colostro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2. a seleção de procedimento para dosagem de vitamina A sérica por CLAE.

3. a aplicação de indicadores dietéticos (inquérito de frequência alimentar), citológicos (teste de impressão citológica do conjuntiva ocular-ICCO) e bioquímicos (dosagem de retinol sérico) na avaliação do estado nutricional em vitamina A das nutrizes.

4. a identificação dos carotenóides mais comumente encontrados no colostro de mães de recém nascidos pretermo, por CLAE.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vitamina A e Carotenóides em Nutrição Humana

2.1.1. Caracterização Química

O termo vitamina A tem sido utilizado para designar genericamente todos os compostos com atividade biológica do todo *trans*-retinol (SKLAN,1987). O todo *trans*-retinol ($R = CH_2OH$), normalmente denominado retinol, é um álcool insaturado, de 20 carbonos, contendo um anel β -ionona e uma cadeia lateral com 4 duplas ligações conjugadas. A fórmula básica da vitamina A é apresentada na Figura 1. O retinaldeído ($R = CHO$) e o ácido retinóico ($R = COOH$) são compostos com atividade biológica intermediária (SKLAN,1987).

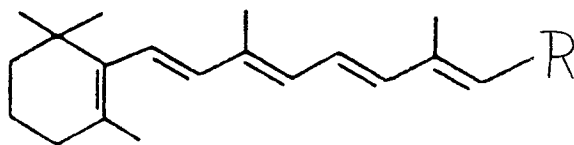


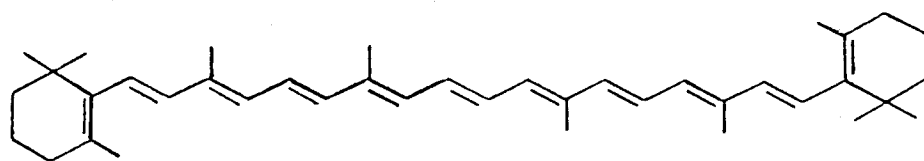
Figura 1: Estrutura química do retinol

Alguns carotenóides, compostos com estrutura básica de 40

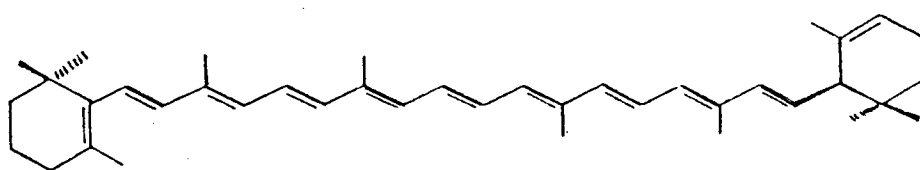
carbonos e formada por 8 unidades isoprenóides (C_5H_8), apresentam atividade de vitamina A e recebem a designação de pró-vitamina A. Há mais de seiscentos carotenóides identificados e destes, apenas cerca de 10% possui atividade de vitamina A (BENDICH & OLSON, 1989). A possibilidade de conversão de carotenóides em retinol depende da presença do anel β -ionona não substituído, com cadeia lateral poliênica de no mínimo onze carbonos. O β -caroteno (composto de dois anéis β -ionona) é o carotenóide com maior atividade de vitamina A e mais amplamente distribuído na natureza. Outros carotenóides com menor atividade são os α e γ -carotenos e a β -criptoxantina (BAUERNFEIND, 1972). O licopeno, em função de sua estrutura, é um carotenóide sem atividade de vitamina A mas é um antioxidante importante, sendo o carotenóide com maior capacidade de sequestro de oxigênio singlet (DI MASCIO et al., 1989). As estruturas de alguns carotenóides são apresentadas na figura 2.

Em função do grande número de duplas ligações conjugadas estes compostos são muito susceptíveis à isomerização e à oxidação. Eles são sensíveis à luz, ao calor, ao oxigênio, a ácidos e a alguns álcalis (OLSON, 1988).

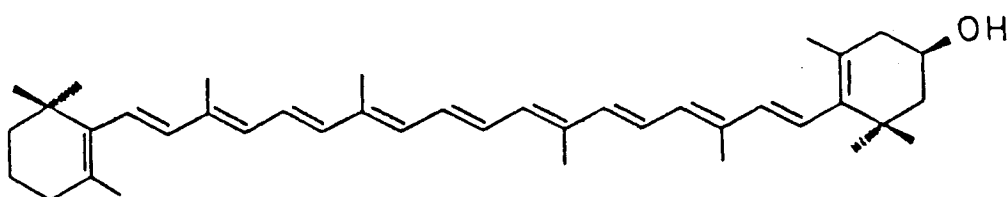
A vitamina A é expressa em equivalente de retinol (ER) definido como 1 μg do todo *trans*-retinol. A eficiência de conversão do β -caroteno a retinol é de cerca de 50% e a absorção média de cerca de um terço, o que resulta em uma utilização de um sexto do β -caroteno ingerido. Considerando-se a utilização de 100% do retinol, assume-se que 1 μg de retinol seja igual a 6 μg de β -caroteno e 12 μg dos demais carotenóides com atividade de vitamina A (OLSON, 1987; SKLAN, 1987). A antiga denominação de unidade internacional (UI) de vitamina A pode ainda ser encontrada e 1 UI corresponde a 0,3 μg de retinol, 0,6 μg de β -caroteno e 1,2 μg dos demais carotenóides pró-vitamina A (OLSON, 1987).



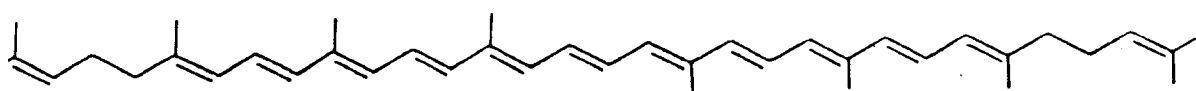
β -Caroteno



α -Caroteno



β -Cryptoxanthin



Lycopene

Figura 2: Estrutura química de alguns carotenóides

2.1.2. Fontes Dietéticas

A vitamina A pré-formada ocorre naturalmente apenas em alimentos de origem animal e apresenta-se principalmente na forma de ésteres de retinol. São importantes fontes deste nutriente o fígado, os leites e os laticínios em geral (SKLAN, 1987).

Os carotenóides são encontrados predominantemente em alimentos de origem vegetal e, em menor proporção, em alguns alimentos de origem animal, como o leite. Em vegetais, eles são encontrados ligados a proteínas ou formando dispersões finas em meio aquoso; em animais apresentam-se em forma de gotículas gordurosas (BAUERNFEIND, 1972). São fontes importantes destes compostos a cenoura, a manga, a abóbora, o buriti e os folhosos verdes entre outros.

2.1.3. Metabolismo

2.1.3.1. Geral

A vitamina A ingerida na alimentação encontra-se predominantemente nas formas de ésteres de retinol e carotenóides e o veículo de transporte de ambas as formas, a nível intestinal, é a gordura (SKLAN, 1987 e OLSON, 1988). No estômago a vitamina A é liberada de suas combinações protéicas através da ação de enzimas proteolíticas, sendo que sua digestão propriamente dita só se processa no intestino (OLSON, 1988). Apenas os ésteres de retinol são clivados no lúmen intestinal pela ação de hidrolases pancreáticas. Seus produtos, juntamente com os carotenóides, os sais biliares e outros produtos lipídicos compõem as micelas. Na forma micelar é viabilizada a absorção destes compostos pelas células da mucosa intestinal e, nesta etapa do processo, a presença de sais biliares é essencial (SKLAN, 1987). A absorção do retinol é mais eficiente que a dos carotenóides (OLSON, 1988). Uma percentagem importante dos

carotenóides pró-vitamina A é oxidada enzimaticamente na mucosa intestinal gerando retinaldeído, que é reduzido a retinol. Todo o retinol formado, originário de fonte animal ou vegetal, será esterificado, incorporado a quilomícrons e levado ao fígado (OLSON, 1988 e SKLAN, 1987). Parte dos carotenóides atravessa intacta a parede intestinal e é posteriormente incorporada aos quilomícrons. Além desta via têm sido sugeridas outras formas de transporte para os carotenóides visto que seu consumo, mesmo em dietas deficientes de gordura, acarreta elevação das taxas séricas destes compostos (DIMITROV *et al.*, 1988).

O fígado constitui o maior depósito de vitaminas lipossolúveis, armazenando cerca de 90% das reservas corporais de vitamina A (OLSON, 1988). Os carotenóides encontram-se principalmente no tecido adiposo (80-85%), depois no fígado (8-12%), nos músculos (2-3%) e em menor proporção em outros tecidos (BENDICH & OLSON, 1989). A maioria dos carotenóides ingeridos pelo homem são absorvidos no intestino. O soro humano contém α e β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno e luteína como seus maiores componentes e menores concentrações de zeaxantina e outras xantofilas. Eles são transportados no sangue associados, principalmente, a lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sendo que os mecanismos de estoque e mobilização dos mesmos no fígado e em outros tecidos ainda não são conhecidos (BENDICH & OLSON, 1989; PARKER, 1989).

A vitamina A é liberada do fígado para os tecidos carregada por uma proteína de ligação específica para o retinol (apo-RBP), na forma de holo RBP (apo-RBP associada ao retinol), que combina-se ainda com uma pré-albumina ligadora de tiroxina (PA). Este complexo chega aos tecidos e é identificado através de receptores específicos possibilitando a absorção da vitamina (DE LUCA *et al.*, 1977 e SKLAN, 1987). Apenas o retinol é absorvido enquanto que a apo-RBP resultante é liberada e hidrolisada principalmente nos rins.

O retinol absorvido é encontrado nos tecidos na forma livre, esterificada ou conjugada com outra proteína carreadora. Ele pode ser oxidado formando retinaldeído e posteriormente ácido retinóico; esterificado e hidrolisado; isomerizado formando compostos 11 *cis* e 13 *cis* ou ainda fosforilado (SKLAN, 1987 e OLSON, 1988), podendo exercer variadas funções.

A principal forma de excreção da vitamina A é a conversão de retinol a metabólitos hidrossolúveis (principalmente retinil β -glucoronídeos) no fígado, que são excretados através da bile nas fezes. Já foi observada excreção urinária de ácido retinóico, retinil e retinol glucoronídeos (SKLAN, 1987). Grande porcentagem de carotenóides, dependendo de sua natureza, biodisponibilidade e quantidade, não é absorvida pelo trato intestinal e é excretada normalmente nas fezes (OLSON, 1988).

Em todo este processo metabólico interagem vários nutrientes como proteínas, lípides, zinco, cobre, vitamina E e outros antioxidantes, que atuam para a adequada utilização da vitamina A e dos carotenóides (DE LUCA *et al.*, 1977).

2.1.3.2. Transferência materna de vitamina A e carotenóides

2.1.3.2.1. Transferência materno-fetal

A nutrição fetal depende da nutrição materna assim como da adequação dos mecanismos de transferência de nutrientes. O processo de regulação e transporte de vitamina A da mãe para o feto ainda não está bem elucidado. A partir de um estudo em sangue de cordão, foi observado que 90% do retinol transferido da gestante para o feto apresenta-se complexado com a proteína carreadora de retinol -RBP- (ISMAD & OLSON, 1975). Estudo utilizando primatas confirma esta via como prioritária e aponta a síntese fetal de RBP, a utilização de RBP secretada no líquido amniótico (que seria engolido pelo feto) e o

transporte via lipoproteínas específicas como recursos outros utilizados pelo feto no decorrer da gestação (VAHLQUIST & NIELSSON, 1984). As taxas de retinol do sangue de cordão são normalmente inferiores às maternas (ARROYAVE *et al.*, 1975; GANGULY & MUKHERJEE, 1988; HUSSEIN *et al.*, 1989), sendo que alguns autores relatam taxas ainda inferiores em recém nascidos pretermo (RNPT) do que em recém nascidos a termo (BRANDT *et al.*, 1978; SHENAI *et al.*, 1981; HUSTEAD *et al.*, 1984). Os níveis séricos adequados em vitamina A e RBP no feto e no recém nascido não refletem necessariamente o estoque hepático em vitamina A. Há indicações de que o feto seja preferencialmente protegido contra a deficiência de vitamina A circulante, em detrimento do depósito hepático (GEBRE-MEDHIN & VAHLQUIST, 1984). Quando há inadequação do estado nutricional materno em vitamina A ocorre diminuição significativa nos depósitos hepáticos fetais (GEBRE-MEDHIN & VAHLQUIST, 1984; SHAH *et al.*, 1987; GANGULY & MUHERJEE, 1988). Através da avaliação do tecido hepático de autópsias de crianças (com diferentes idades) constatou-se que, mesmo em condições de aparente adequação do suprimento de vitamina A durante a gestação, a maior parte do estoque hepático é armazenado no período pós-natal (GEBRE-MEDHIN & VAHLQUIST, 1984).

Em relação à transferência materno-fetal de carotenóides pouco se tem estudado. As taxas séricas maternas de carotenóides apresentam incremento no decorrer da gestação e, em geral, refletem o consumo recente de carotenóides, não correlacionando-se com o estado em vitamina A da gestante (PANTH *et al.*, 1990). O maior depósito corporal de carotenóides é o tecido adiposo e o que se observa, em cirurgias, é a ausência da coloração amarela (característica do depósito de carotenóides) neste tecido em recém nascidos. Através da avaliação de tecido hepático, de autópsias, não foi observada correlação entre os teores hepáticos de carotenóides e a idade gestacional ou ainda com teores de vitamina A (OLSON *et al.*, 1984). A concentração de β -caroteno encontrada por OSTREA *et al.* (1986) em sangue de cordão, correspondeu a aproximadamente uma oitava parte do

valor materno, sendo os valores dos RNPT ainda inferiores aos dos recém nascidos a termo. As concentrações de carotenóides séricos observadas nos primeiros seis meses de vida são muito baixas. Entretanto, nos primeiros três meses, as crianças alimentadas com leite materno apresentam taxas séricas significativamente maiores que as alimentadas com fórmulas (LEUNG *et al.*, 1990).

É importante, portanto, a oferta destes nutrientes ao neonato, prevenindo-se a instalação de deficiências e as consequências advindas deste processo.

2.1.3.2.2. Transferência materno-infantil

Após o nascimento, a transferência de vitamina A e de carotenóides da mãe para o filho viabiliza-se através do leite materno. O leite materno é um alimento rico nestes nutrientes, sendo a forma mais adequada para o suprimento das necessidades dos neonatos. Os mecanismos de transferência da vitamina A e dos carotenóides do plasma para o leite também não estão bem elucidados. Em estudos com primatas, observou-se que 80 a 90% do retinol é transportado do plasma para o leite ligado a RBP, por processo envolvendo receptores celulares. O restante apresenta-se ligado a lipoproteínas séricas e é transportado, provavelmente, por difusão (VAHLQUIST & NIELSSON, 1979).

A influência do estado nutricional materno em vitamina A sobre os teores de vitamina A do leite ainda não está bem estabelecida. Estudos realizados na área apresentam resultados controversos, havendo, portanto, necessidade de aprofundamento da questão. Estudos na Índia (GARG *et al.*, 1988) e no Paquistão (LINDBLAD & RAHIMTOOLA, 1974) não evidenciaram diferença significativa entre os teores de vitamina A dos leites de mães bem e mal nutridas. Já estudo comparando a composição do leite de mães suecas privilegiadas e mães etíopes privilegiadas e carentes apresentou concentrações médias de retinol de 47,8, 36,2 e 29,0 $\mu\text{g/dl}$, respectivamente. Os valores de RBP

plasmáticos eram significativamente superiores para as mães suecas, o que parece ter-se refletido na composição do leite (GEBRE-MEDHIN et al., 1976). Outro estudo avaliando a composição do leite de mulheres navajas, relatou teor médio de vitamina A de 32,9 µg/dL e correlação altamente positiva com os valores séricos de retinol (BUTTE & CALLOWAY, 1981). Em estudo recente foi apresentada correlação positiva entre a ingestão de α e β -caroteno e a composição do leite materno nestes nutrientes (KIM et al., 1990).

2.1.4. Funções

2.1.4.1. Vitamina A

A vitamina A é um nutriente cuja essencialidade foi por muito tempo associada apenas a lesões oculares graves acompanhadas de cegueira e baixa capacidade visual noturna. Atualmente são reconhecidos vários efeitos sistêmicos deste nutriente incluindo inclusive na morbi-mortalidade infantil (SOMMER et al., 1983; MILTON et al., 1987; TARWOTJO et al., 1987).

A vitamina A é necessária à visão atuando em diferentes mecanismos. Na retina, o retinol exerce papel estrutural compondo o pigmento visual (rodopsina) e atuando na neuro-transmissão e percepção da luz no processo de adaptação claro-escuro (SKLAN, 1987). Na córnea, a vitamina A participa do processo de manutenção da integridade tecidual, atuando na diferenciação das células caliciformes (glândulas unicelulares produtoras de muco) da conjuntiva. A ausência do muco, produzido por estas células, compromete a continuidade do filme lacrimal, que protege o epitélio da córnea. A secura deste epitélio pode acarretar lesões e até ulcerações na córnea (DE LUCA et al., 1977).

A vitamina A é indispensável na diferenciação e manutenção dos epitélios teciduais (DE LUCA et al., 1979; ROJANAPO et al., 1980;

DE LUCA & DOWELL, 1989) estando consequentemente envolvida nos processos de crescimento e desenvolvimento. Sua necessidade se faz ainda mais evidente em tecidos com elevado "turnover" celular como os tratos respiratório, gastrointestinal e genitourinário, além do epitélio da conjuntiva. A integridade epitelial contribui para a defesa do organismo visto que os epitélios são a primeira barreira à invasão de patógenos. A vitamina A atua ainda no sistema imune em mecanismos específicos (sistema humoral e imunidade celular) e inespecíficos (produção de muco, fagocitoses inespecíficas, etc) de defesa (CHANDRA & VYAS, 1989 e WEST JR et al., 1989). A deficiência de vitamina A afeta a imunidade através do comprometimento da linfopoiese e da maturação de linfócitos; da produção anormal de citocinina; de alterações estruturais de membranas afetando receptores para antígenos, moléculas acessórias e citocininas; do comprometimento da retirada de patógenos por mecanismos citotóxicos e fagocitários; de alterações na morfologia e no número de células de órgãos, dentre outros mecanismos (ROSS, 1992). A hipovitaminose A tem sido associada ao aumento de susceptibilidade a infecções principalmente dos tratos gastrointestinal (FEACHEM, 1987) e respiratório (SOMMER et al., 1984) sendo que, mesmo na forma sub-clínica, a carência aparece associada ao desenvolvimento de diarreias e doenças respiratórias (SOMMER et al., 1987). O papel da vitamina A nos processos infecciosos e sua interação com a morbi-mortalidade infantil foram discutidos em revisão recente que reforça a importância deste nutriente para o adequado crescimento infantil (PASSOS & BARROS FILHO, 1992).

A vitamina A atua ainda na reprodução. A deficiência deste nutriente acarreta desde alterações epiteliais dos aparelhos reprodutivos, até o comprometimento da espermatogênese. A maioria dos estudos nesta área foram realizados com animais e observa-se a ocorrência de reabsorção fetal, prematuridade e malformações congênitas em cobaias com deficiência de vitamina A (DE LUCA et al., 1977; BATES, 1983; OLSON, 1988). Em humanos, há relatos de malformações congênitas associadas a hipovitaminose A e,

principalmente, a ingesta de megadoses de vitamina A, por parte de gestantes. (BENDICH & LANGSETH, 1989).

O papel da vitamina A na prevenção e tratamento de cânceres tem sido bastante discutido. A vitamina A atua de forma determinante na diferenciação e proliferação celular e seus efeitos já foram demonstrados em células normais e neoplásicas (LOTAN, 1980). Como a carcinogênese é fundamentalmente uma desordem na diferenciação celular, é factível que o "estado" de vitamina A de uma célula influencie em seu potencial para o desenvolvimento de câncer. A possibilidade do combate ao câncer através de agentes que controlem a diferenciação celular ao invés da eliminação (morte) das células, é um dos atrativos para estudos na área (SPORN & ROBERTS, 1984). Grande número de estudos epidemiológicos têm sido realizados com o intuito de associar-se o estado nutricional em vitamina A de populações e o risco de desenvolvimento de câncer, mas limitações metodológicas e interações com outros nutrientes comprometem a interpretação dos mesmos. Em estudo longitudinal (1968-1977) publicado recentemente (KNEKT et al., 1990), constatou-se que maiores taxas de retinol sérico estavam associadas a menor risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer, principalmente o pulmonar e urinário. Retinóides estruturalmente similares a vitamina A têm apresentado algum efeito terapêutico e protetor contra certos tipos de câncer, quando utilizados em doses farmacológicas e por longos períodos de tempo, em modelos experimentais com animais (BOLLAG & HARTMAN, 1983). Entretanto a ingestão, dentro de limites recomendados (NRC-RDA, 1989), de vitamina A (através do consumo de alimentos) por indivíduos com adequado estado nutricional não parece associado a proteção contra câncer. Discutindo o papel da vitamina A na prevenção e tratamento de cânceres, OLSON (1986) ressalta a necessidade de critérios no estabelecimento de relações terapêuticas e preventivas entre um dado nutriente e o câncer, visto ser diversa e pouco esclarecida a etiologia desta doença.

2.1.4.2. Carotenóides

A atividade pró-vitamínica, apresentada por alguns carotenóides, é uma das importantes funções deste grupo de nutrientes. Embora a maioria dos carotenóides não apresente tal característica e mesmo os pró-vitamínicos apresentem diferentes níveis de atividade, eles contribuem de forma significativa para o aporte de vitamina A. Segundo SIMPSON (1983), os carotenóides constituem a maior fonte de vitamina A da dieta correspondendo a aproximadamente 68% a nível mundial e 83% nos países em desenvolvimento.

Atualmente tem havido grande interesse com relação ao papel dos carotenóides no sistema imunitário. Eles parecem apresentar impacto positivo em duas importantes funções deste sistema, a defesa contra patógenos e a prevenção de tumores. Estudos em animais têm evidenciado a atuação de carotenóides em diversos mecanismos de defesa, dadas as suas propriedades antioxidante e sequestrante de oxigênio singlet e não necessariamente a sua atividade de vitamina A. O β -caroteno tem sido apontado como protetor da auto-oxidação de fagócitos, promotor do aumento de resposta proliferativa de linfócitos B e T e da capacidade de combate de macrófagos e células T citotóxicas, assim como do aumento de produção de certas interleucinas (BENDICH, 1989). Muitos destes efeitos foram observados com outros carotenóides sem atividade de vitamina A. O mecanismo pelo qual cada carotenóide produz esses efeitos no sistema imune ainda não estão claros.

Os carotenóides apresentam uma estrutura que lhes permite intensificar sua função imune através do sequestro de oxigênio singlet e de outras espécies oxígeno-reativas, incluindo radicais livres. Eles podem agir contra a oxidação de membranas, organelas e proteínas, podendo também atuar em conjunto com outros antioxidantes principalmente vitamina E e A. Os antioxidantes têm potencial para inibir a carcinogênese e outros processos danosos relativos a eventos

oxidativos (CANFIELD et al., 1992). Como agentes antineoplásicos os carotenóides apresentam grande especificidade com relação a órgão alvo e, por vezes, a espécie. A maioria dos estudos emprega modelos tumorais em animais ou levantamentos populacionais de consumo de carotenóides versus incidência de câncer e os melhores resultados têm sido com relação a trato respiratório, digestivo, urinário e pele (ZIEGLER, 1989). Um grande número de estudos epidemiológicos tem associado baixo consumo de frutas, vegetais e carotenóides, assim como baixas taxas séricas de carotenóides, com maior risco de desenvolvimento de câncer, principalmente pulmonar. Como no caso da vitamina A, deve-se ter critério na interpretação destes dados e há necessidade de mais estudos principalmente com relação a outros compostos presentes nos vegetais e que poderiam atuar no processo de prevenção e/ou terapia de neoplasmas (ZIEGLER, 1991).

Recentemente tem sido relatado o papel do β -caroteno como protetor contra a catarata. Ele atuaria na proteção da lente ocular contra danos causados por oxi-radicais (JACQUES et JACQUES & CHYLACK, 1991).

Os carotenóides têm sido também associados a menor incidência de doenças cardiovasculares (DCV). No processo de aterosclerose eles agiriam protegendo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) de oxidação. Esta atuação baseia-se em um novo mecanismo proposto para a gênese da aterosclerose, no qual a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das LDL seria o passo principal para o desenvolvimento da aterosclerose, em altas concentrações de LDL (GERSTEP, 1991). Em estudo epidemiológico duplo cego, foi demonstrado que o tratamento com β -caroteno (50 mg em dias alternados) reduziu em cerca de 50% os eventos cardiovasculares no grupo de risco (história de angina pectoris estável e/ou revascularização coronariana) quando comparado com tratamento placebo (HENNEKENS & EBERLEIN, 1985). Além da atuação do β -caroteno como antioxidante, foi observado o aumento de lipoproteínas de muito alta densidade (HDL) em alguns estudos

utilizando suplementos do caroteno (GERSTEP, 1991). Ambos os efeitos tornam-se mais evidentes com tratamento contínuo e prolongado.

A suplementação com carotenóides não acarreta as intoxicações, alterações mutagênicas ou embriotóxicas associadas ao consumo excessivo de vitamina A (HEYWOOD *et al.*, 1985, DIMITROV *et al.*, 1988).

2.1.5. Recomendações dietéticas

O requerimento de vitamina A tem sido estimado com base nas quantidades necessárias à correção de cegueira noturna, eletroretinogramas anormais e hiperqueratose folicular em indivíduos depletados; à normalização de taxas plasmáticas em indivíduos com hipovitaminose A (HA) e à manutenção de indivíduos bem nutridos (OLSON, 1987).

Os estudos mais clássicos nesta área foram os de "depleção-repleção" realizados por HUMES & KREBS (citado por OLSON, 1987), no período da segunda guerra mundial, e por SAUBERLICH *et al.* (1974). No primeiro estudo foi registrado que um consumo de 390 µg de retinol por dia seria o mínimo necessário para a manutenção da adequação em homens e que a recomendação preconizada de 750 µg/dia permitiria ampla faixa de segurança para as variações individuais e manutenção da reserva hepática. No estudo de SAUBERLICH *et al.* (1974) constatou-se cura ou redução de sinais de deficiência, em muitos dos casos, com o consumo de 300 µg de retinol por dia. A cura dos sinais clínicos e aumento do retinol plasmático para níveis superiores a 20 µg/dL, foram observados com o consumo de 600 µg/dia.

As recomendações de vitamina A, assim como de outros nutrientes, variam de país para país. A recomendação para mulheres varia de 600 a 1500 ER/dia, o adicional para gestantes de 0 a 1000 e para nutrízes de 200 a 1920 (TEE, 1992). A recomendação da FAO/WHO

(1988) é de 500 ER/dia para a mulher, 600 para a gestante e 850 para a nutriz, enquanto que a atual recomendação americana (RDA - Recommended Dietary Allowances) preconiza a ingestão de 800 ER/dia para mulheres grávidas ou não e incrementos de 500 e 300 ER/dia para o primeiro e segundo semestre de lactação respectivamente (NRC-RDA, 1989). Neste estudo serão utilizados os parâmetros da RDA-1989 como referência.

No período de gestação, a quantidade de retinol requisitado pelo feto é mínima (cerca de 9% do pool materno) o que não determina suplementação para mulheres saudáveis. Entretanto, em função da essencialidade deste nutriente para o bom desenvolvimento da gestação, justificam-se acréscimos controlados para mulheres desnutridas, com baixas reservas hepáticas (OLSON, 1987).

As recomendações para nutrízes são baseadas na produção (volume e composição) do leite materno. A produção diária de 750 mL de leite materno (primeiro semestre) com teor médio de 50 µg retinol/dL implica na secreção de 300-525 µg retinol/dia. No período de seis meses, 54-95 mg de retinol são secretados o que corresponde a 26-46% das reservas maternas (OLSON, 1987). Recomenda-se, portanto, um acréscimo de 500 µg de retinol/dia para a manutenção das reservas maternas, levando em consideração a variação normal do volume do leite e uma margem de segurança. Com a queda de produção láctea no segundo semestre para cerca de 600 mL/dia, o incremento preconizado é de 400 µg/dia (NRC-RDA, 1989).

Para crianças de até um ano de idade a recomendação de vitamina A é estimada em função do conteúdo desta vitamina no leite materno e do volume médio ingerido. Considerando teores médios de 50 µg retinol/100 mL de leite e o consumo de 750 mL leite/dia, o aporte de vitamina A por parte do lactente seria de cerca de 350 µg/dia e é este o valor preconizado como adequado ao crescimento de crianças saudáveis (NRC-RDA, 1989). Um neonato a termo, sadio, pesando cerca de

3,5 kg, com 3 a 7 dias de idade ingerindo 150 mL de leite materno/kg/dia recebe aproximadamente 250 µg de retinol (ZACHMAN, 1989). Foi observado que mesmo ingestas inferiores a 100-200 µg retinol/dia não estão associadas a sinais e sintomas de deficiência de vitamina A ou redução de crescimento em neonatos alimentados ao seio (OLSON, 1987). A recomendação de 350 µg retinol/dia parece, portanto, suficiente ao atendimento das necessidades de lactentes saudáveis .

Com relação aos carotenóides, não há recomendações dietéticas estipuladas embora haja registro de valores de 20-40 µg de carotenóides totais por cada 100mL de leite materno (OLSON, 1987).

2.1.6. Métodos de avaliação do estado nutricional em vitamina A e carotenóides

2.1.6.1. Vitamina A

Vários tipos de indicadores têm sido propostos com o intuito de se estimar o estado nutricional em vitamina A de um indivíduo: 1- avaliação de sinais e sintomas associados a hipovitaminose A (HA), com particular atenção para os olhos, 2- inquéritos dietéticos avaliando a ingestão de vitamina A e seus precursores (SANTOS, 1988), 3- exames citológicos oculares (NATADISASTRA *et al.*, 1988) e 4- dosagens bioquímicas de vitamina A e carotenóides em fluidos e tecidos (ARROYAVE *et al.*, 1982).

-Indicadores clínicos de HA (sinais e sintomas)

As manifestações clínicas refletem-se em alterações oculares com diferentes graus de intensidade que vão desde cegueira noturna até queratomalácia, podendo levar à cegueira total. A cegueira noturna é um sintoma de difícil detecção enquanto que as úlceras corneais graves são menos frequentes e não possuem valor preditivo (SANTOS, 1988).

Segundo o International Vitamin A Consultative Group -IVACG- (DE LUCA et al., 1977) a presença de mancha de Bitot em 2% dos examinados ou queratomalácia e ulceração da córnea em 0,01% da amostra estudada é indicador de endemicidade de HA, configurando-se problema de saúde pública. Tais valores, por serem numericamente pequenos, são bons indicadores apenas para grandes amostras, ou seja, para diagnósticos populacionais.

-Indicadores dietéticos

Os indicadores dietéticos são normalmente obtidos através de inquéritos nutricionais. O questionário de frequência alimentar específico para um nutriente tem-se mostrado um bom instrumento para a estimativa da dieta usual de uma população, principalmente para nutrientes cujo consumo apresente grande variabilidade como a vitamina A (MARGETTS et al., 1989). Considerando-se, criteriosamente, a frequência de consumo de certos alimentos e o porcionamento dos mesmos, tem sido possível inferir sobre o consumo de vitamina A e carotenóides de grupos (WILLET et al., 1983; ROIDT et al., 1988). É de fundamental importância o detalhamento e cuidado na coleta das informações dietéticas e o critério na utilização de tabelas de composição de alimentos, visto que o conteúdo de vitamina A nos alimentos varia em função de sazonalidade, espécie e características de cultivo ou manejo (BATISTA FILHO, 1989 e SANTOS, 1988). Além disto são frequentes os desvios de super e subestimação dos valores, principalmente de carotenóides, consignados na maioria das tabelas disponíveis (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

-Exame citológico ocular

O teste de impressão citológica da conjuntiva ocular (ICCO) é um método baseado na redução do número de células caliciformes e nas alterações morfológicas das células epiteliais da conjuntiva bulbar, decorrentes da deficiência de vitamina A. uma técnica simples e

prática que, segundo os autores (WITTPENN *et al.*, 1986; NATADISASTRA *et al.*, 1988; AMEDEE-MANESME *et al.* 1988) possibilita a detecção da carência de vitamina A sub-clínica. Ainda não estão estabelecidos critérios epidemiológicos de endemicidade para este indicador, mas o mesmo apresenta-se como um recurso rápido e não invasivo de diagnóstico precoce.

-Indicadores bioquímicos

Os indicadores bioquímicos mais utilizados são as dosagens séricas e hepáticas de retinol. Os valores séricos de vitamina A, por causa do controle homeostático exercido pelo fígado, não são bons indicadores do estoque corpóreo de vitamina A. Entretanto, baixos teores são sugestivos de estado de depleção, na ausência ou na presença de sinais clínicos de HA (ARROYAVE *et al.*, 1982). As dosagens séricas são as mais comumente realizadas em estudos populacionais, apresentam relativa facilidade de coleta de material e possibilitam a comparação com os resultados já descritos na literatura. A HA é tida como endêmica quando 5% da população examinada apresenta valores de retinol sérico inferiores a 10 $\mu\text{g/dL}$ de plasma ou inferiores a 20 $\mu\text{g/dL}$ em 15% da amostra. As reservas hepáticas são tidas como inadequadas quando os níveis de retinol forem inferiores a 5 $\mu\text{g/g}$ (SANTOS, 1988). O retinol hepático é o indicador mais representativo do estado nutricional em vitamina A, mas a necessidade de biópsia hepática inviabiliza a utilização deste método como instrumento de diagnóstico populacional. Outro método utilizado é o RDR (resposta a uma dose relativa de vitamina A), no qual se avalia indiretamente o estoque hepático de vitamina A (FLORES *et al.*, 1984) e que possui como inconveniente a necessidade de duas coletas de sangue com intervalo de cinco horas entre elas OLSON *et al.* (citado por UNDERWOOD, 1990) têm testado o RDR modificado no qual utiliza-se dehidroretinol e apenas uma dosagem sérica, mas que implica na utilização de cromatografia líquida de alta eficiência para realização das dosagens.

A quantificação do conteúdo de vitamina A do leite materno também pode contribuir para a avaliação do estado nutricional em vitamina A de populações. Em grupos com consumo inadequado de vitamina A, as nutrizes geralmente secretam leites com teores mais baixos deste nutriente. Teores inferiores a 20 μg de retinol para cada 100 mL de leite materno, em 15 % da população estudada, caracterizam inadequação do ponto de vista de saúde pública e necessidade de intervenção visando melhora do estado nutricional em vitamina A (ARROYAVE et al., 1982).

Cada classe de indicadores nutricionais apresenta limitações, sejam técnicas (acessibilidade, sensibilidade e especificidade do método), e econômicas e/ou éticas (processos invasivos).

2.1.6.2. Carotenóides

Os carotenóides encontrados no plasma são indicadores do consumo recente de alimentos contendo carotenóides, mas não são bons instrumentos para avaliação do estado nutricional de vitamina A nem da reserva de carotenóides. Normalmente 15 a 60% do total dos carotenóides plasmáticos é constituído de pró-vitamina A mas esta percentagem pode variar significativamente sendo que, em geral, os carotenóides contribuem apenas com 1 % da reserva corpórea de vitamina A (DE LUCA et al., 1977). A heterogeneidade interindividual dos níveis séricos totais e individuais dos carotenóides é substancial. Portanto, o valor total de carotenóides séricos por si só não classifica quanto ao estado nutricional em carotenóides ou em vitamina A, mas analisado em conjunto com as informações dietéticas e os teores de retinol sérico, pode ser auxiliar e confirmativo no estabelecimento do diagnóstico nutricional (ARROYAVE et al., 1982).

Há poucos estudos avaliando os carotenóides em tecidos sólidos mas é também observada grande variação de teores. Não há critérios estabelecidos para classificações nutricionais em função dos

teores de carotenóides em tecidos. A relação entre os tipos e as concentrações dos carotenóides circulantes e os tecidos sólidos (principalmente tecido adiposo) de indivíduos não está estabelecida, mas investigações recentes apresentam considerável homologia entre os carotenóides séricos e os encontrados em tecido adiposo de um mesmo indivíduo (PARKER, 1989). Há também poucos estudos sobre a concentração de carotenóides, dosados isoladamente, em leite humano (PATTON *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 1990), assim como sobre as possíveis relações com os teores séricos destes nutrientes. A concentração dos carotenóides mais comumente encontrados no leite também apresenta grande variabilidade interindividual. Há necessidade do estudo do tipo e da concentração dos diversos carotenóides nos vários tecidos humanos, para o esclarecimento dos mecanismos de depósito e utilização dos carotenóides pelo organismo e para o aprofundamento das relações entre os valores séricos destes nutrientes e doenças crônicas (PARKER, 1989).

2.2. Dosagem de retinol e carotenóides nos fluidos corporais

2.2.1. Dosagem de retinol no soro e no leite materno

Uma série de técnicas pode ser empregada para a determinação do retinol em fluidos corporais. O quadro 1 apresenta, resumidamente, o fundamento, as vantagens e as desvantagens das técnicas mais utilizadas (ARROYAVE *et al.*, 1982; PARRISH *et al.*, 1985). A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) introduziu avanços importantes na determinação destes compostos em diferentes matrizes (SCOTT, 1992) e é a técnica atualmente recomendada pelo IVACG (ARROYAVE *et al.*, 1982). A CLAE apresenta como vantagens em relação às demais técnicas, maior reprodutibilidade, rapidez, sensibilidade e capacidade de separação de compostos e para este estudo, em particular, é ainda fundamental a possibilidade de trabalhar-se com pequenos volumes.

O procedimento analítico básico implica na precipitação e separação dos componentes protéicos da amostra em presença de etanol, extração do retinol em hexano, evaporação do extrato, dissolução em fase móvel e injeção no cromatógrafo. No caso do leite, é necessário a prévia saponificação da amostra, visto que a elevada proporção de glicerídeos presentes nesta matriz interfere na dosagem.

MÉTODO	PRINCÍPIO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Colorimetria	retinol em presença de ácido de Lewis forma solução azul cuja absorbância a 620nm é função da concentração do retinol	-reação rápida e fácil -alta sensibilidade -utilização de aparelhagem comum em laboratório	-reação com carotenóides e compostos similares -baixa especificidade
Espectrofotometria por Inativação Ultra Violeta	retinol é destruído quando exposto à luz U.V. faz-se a leitura do extrato a 328nm, irradia-se com U.V. e repete-se a leitura, a diferença corresponde à concentração de retinol	-aparelhagem comum em laboratórios	-manipulação de fonte de irradiação
Fluorimetria	retinol apresenta fluorescência cuja emissão é medida a 480nm após excitação a 330nm	-alta sensibilidade -maior especificidade que medidas de absorbância	-contaminantes fluorescentes -equipamento caro -procedimento trabalhoso.
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	retinol apresenta retenção seletiva e migração diferencial em CLAE e é quantificado em detector U.V.	-rapidez -alta sensibilidade e reprodutibilidade -utilização de pequenos volumes	-alto custo do equipamento e de sua manutenção -alta especialização do operador

Quadro 1: Técnicas mais utilizadas para dosagem de retinol

2.2.2. Dosagem de carotenóides em leite materno

O estudo da composição do leite materno envolve uma série de questões éticas e metodológicas. A abordagem à nutriz deve ser de forma a não intervir no processo de lactação. A expressão manual, quando adequadamente procedida, revela-se uma técnica prática e fácil, podendo inclusive ser útil na localização e "dissolução" de ingurgitamentos. No caso de mães de RNPT, esta abordagem é facilitada pois geralmente já se faz necessária a expressão do leite, caso a mãe queira ofertá-lo, em função de peculiaridades fisiológicas do RNPT.

A composição do leite de uma mesma mulher varia durante o dia (HYTTEN, 1954; HALL, 1979; BROWN *et al.*, 1982; JACKSON *et al.*, 1988), durante a mesma mamada (HYTTEN, 1954; HALL, 1979; NEVILLE *et al.*, 1984), de acordo com o período de lactação (CHAPPELL *et al.*, 1985) e de mama para mama (BROWN *et al.*, 1982; NEVILLE *et al.*, 1984). Estas variações se fazem mais marcantes em relação aos lipídeos, incluindo as vitaminas lipossolúveis (GURR, 1981). Portanto, a forma, a duração e o período da coleta podem comprometer a qualidade dos dados obtidos. Uma maneira de minimizar estas variações é efetuar a expressão manual completa da ambas as mamas, a cada três horas, durante um período de vinte e quatro horas. São coletadas alíquotas proporcionais de todas as ordenhas que compõem um "pool" representativo de um dia. Este procedimento possibilita a obtenção de amostras representativas mas torna o processo de coleta mais trabalhoso e limitado, visto que é imprescindível que o volume de leite obtido em cada ordenha ultrapasse as necessidades do lactente. Além disto, as nutrízes têm que se adaptar à técnica de expressão manual e, no caso da coleta de colostro especificamente, deve-se ressaltar que a produção de cada mulher é muito variável, podendo ser bastante reduzida (WORTHINGTON, 1986).

A técnica mais utilizada para a separação dos carotenóides é a cromatografia de coluna aberta. A determinação individual de carotenóides em alimentos tem sido bastante estudada e têm sido

obtidos bons resultados (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 1988). Entretanto, tal procedimento implica na utilização de volumes relativamente grandes de amostras, o que inviabiliza sua aplicação ao estudo em questão. Assim como para vitamina A, a cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica atualmente mais recomendada para determinação de carotenóides em fluidos corporais (ARROYAVE *et al.*, 1982). Além das já referidas vantagens, a CLAE possibilita a separação e quantificação dos diferentes pigmentos e de seus isômeros ao mesmo tempo. Apesar de todas estas vantagens o potencial desta técnica não tem sido bem aproveitado com relação à dosagem de carotenóides e há necessidade de aprimoramento de etapas do processo analítico (SCOTT, 1992).

2.3. Recém nascido pretermo (RNPT), vitamina A e carotenóides

A designação recém nascido pretermo (RNPT) engloba um grupo heterogêneo de crianças nascidas antes de 37 semanas de gestação (259 dias completos) (OMS, 1976). Este grupo apresenta uma série de peculiaridades em função da interrupção do processo normal de uma gestação que se completaria entre a 37^a e 42^a semana. Neste estudo foram selecionadas crianças com idade gestacional (IG) inferior a 34 semanas na tentativa de obter-se um grupo menos heterogêneo. Os RNPT apresentam características anatômicas e fisiológicas diversas dos recém nascidos a termo. O prematuro é um feto cujo desenvolvimento intrauterino foi interrompido e seus órgãos, ainda imaturos, terão que assumir funções para as quais ainda não estão preparados. O funcionamento deles, portanto, apresenta algumas desvantagens fisiológicas as quais refletem manifestações clínicas mais ou menos intensas de acordo com o grau de imaturidade (COMADINI *et al.*, 1975).

A atenção nutricional a este grupo é fundamental visto que a prematuridade pode acarretar diferentes graus de comprometimento na digestão, absorção, mobilização e excreção dos nutrientes. Os RNPT apresentam ainda crescimento pós-natal acelerado, não dispõem de

estoques adequados de muitos nutrientes e estão mais predispostos a situações de estresse, condições estas que acarretam maior demanda de nutrientes (ORZALEST & COLARIZI, 1982). Em adição a tais peculiaridades há problemas relativos ao tipo de alimentação (leite materno, formulados, soluções enterais ou parenterais) e à via de administração do alimento (ZACHMAN, 1989).

Com relação à vitamina A alguns autores têm observado menores taxas séricas de retinol em RNPT quando comparados com recém nascidos a termo (BRANDT *et al.*, 1978; SHENAI *et al.*, 1981; HUSTEAD *et al.*, 1984, YASSAI & MALEK, 1987). Há discrepância com relação aos valores de retinol hepático de RNPT relatados na literatura e, enquanto alguns estudos demonstram aumentos estatisticamente significativos do depósito hepático de retinol com a idade gestacional (SHAH *et al.*, 1987; GANGULY & MUHKERJEE, 1988), outros não encontram tal associação (LYENGAR & APTE, 1972; OLSON *et al.*, 1984). De fato o estoque de retinol é acumulado nos tecidos fetais no decorrer da gestação, como observado em estudo utilizando o peso aproximado de fígados, obtidos de autópsias, para o cálculo da reserva corpórea de retinol (ZACHMAN, 1989). Constatou-se que a reserva de recém nascidos com 38 a 40 semanas de gestação seria cerca de duas vezes a reserva de recém nascidos com 25 a 32 semanas. Ainda com relação ao estoque hepático, os RNPT apresentam uma diminuição na concentração de retinol nos primeiros dois meses de vida, ao contrário do incremento observado nos recém nascidos a termo (OLSON *et al.*, 1984). Os RNPT apresentam também valores plasmáticos de RBP e pré-albumina inferiores aos dos recém nascidos a termo (BATHIA & ZIEGLER, 1983; SASANOW *et al.*, 1986), o que pode comprometer a mobilização de vitamina A. Além destes fatores, vale ressaltar importância do depósito hepático pós-natal de vitamina A, mesmo quando do adequado suprimento desse nutriente no período fetal (GEBRE-MEDHIN & VAHLQUIST, 1984). Segundo OSTREA *et al.* (1986), os teores de sangue de cordão de RNPT também são inferiores aos dos recém nascidos a termo, embora as taxas séricas de mães de neonatos a termo e pretermo não apresentem diferenças significativas.

No período pós-natal é difícil estabelecer as reais necessidades nutricionais e avaliar a ingesta de vitamina A do RNPT. Os RNPT apresentam maior predisposição a complicações metabólicas e infecções e são submetidos mais frequentemente a intervenções do tipo foto e oxigenoterapia. Tais condições acarretam maior demanda de nutrientes que, como a vitamina A e os carotenóides, atuam na diferenciação e manutenção tecidual, no sistema imunitário e/ou que possuam propriedade antioxidante. As complicações respiratórias também são frequentes entre os RNPT sendo que a vitamina A, atuando na diferenciação e manutenção das células epiteliais, pode influir na recuperação do trato respiratório. Seu papel torna-se mais evidente quando observa-se que um quarto das células da região alveolar dos pulmões é composto de células epiteliais. Estudo de suplementação com vitamina A em RNPT demonstrou diminuição significativa da morbidade e incidência de displasia broncopulmonar em RNPT susceptíveis a seu desenvolvimento (sendo submetidos a ventilação mecânica e suplementação de oxigênio) (SHENAI et al., 1987). Os carotenóides podem exercer papel importante protegendo os tecidos de espécies oxígeno-reativas, evitando processos danosos relativos a eventos oxidativos e promovendo mecanismos de resposta imune.

Outro fator complicante é a via de administração da alimentação para o RNPT, já que muitas destas crianças não apresentam condições de sugar o seio materno. Alguns autores têm apontado problemas tais como: intercorrências decorrentes da adaptação de volumes apropriados versus concentração de nutrientes das soluções oferecidas via enteral ou parenteral, a adsorção de retinol aos tubos de administração de preparações intravenosas (GUTCHER et al., 1984), as perdas por fotodegradação do retinol de leites (BATES et al., 1985) ou a ausência de fórmulas contendo carotenóides (LEUNG et al., 1990). Além disto a ingesta calórica do RNPT pode ser inadequada por dias, acarretando ingesta insuficiente de vitamina A (ORZALEST & COLARIZI, 1982).

Todos estes fatores justificam a classificação dos RNPT como grupo de risco nutricional com relação à vitamina A.

A composição do leite materno varia quantitativa e qualitativamente adaptando-se às particularidades de crescimento e desenvolvimento do recém nascido. O melhor leite para o recém nascido é o de sua própria mãe, principalmente no caso de RNPT (MARTINS FILHO, 1984). Estudos comparando a composição do leite de mães de recém nascidos a termo e pretermo apresentam resultados controversos, mas, de modo geral, alguns nutrientes estão presentes em concentração mais elevada no leite de RNPT (LAURINDO *et al.*, 1992). Com relação aos lipídios, alguns autores relatam concentrações superiores no leite de RNPT (ANDERSON *et al.*, 1981; BITMAN *et al.*, 1983), enquanto que outros não confirmam este achado (GROSS *et al.*, 1981; SANN *et al.*, 1981; LEMONS *et al.*, 1982). Os próprios autores postulam que tais variações podem decorrer de diferenças metodológicas, principalmente no que diz respeito à coleta do leite. O leite materno, particularmente o colostro, é fonte importante de vitamina A e carotenóides (PATTON *et al.*, 1990) e o alimento mais adequado ao suprimento das necessidades gerais do neonato. O leite materno pode ser classificado em função do estágio de lactação em colostro, leite de transição e leite maduro. A definição do período de secreção de cada uma destas fases difere entre os autores. MARTINS FILHO (1984) define como colostro o leite secretado nas três primeiras semanas pós-parto, podendo estender este período para todo o primeiro mês. Para WORTHINGTON (1986) colostro é o leite secretado nos primeiros três a cinco dias, leite de transição é o secretado do 3^o ao 15^o dia pós-parto e leite maduro é o produzido após este período. Este mesmo autor ressalta que nenhum destes períodos é fixo. LAURINDO *et al.* (1992) adotam esta mesma classificação. Neste estudo convencionou-se denominar de colostro o leite secretado até o 3^o dia pós-parto e de leite maduro o leite secretado após o 15^o dia.

O colostro é um líquido denso, transparente e amarelado, em

função de sua alta concentração em carotenóides. Ele é secretado em volumes de 2 a 20 mL/mamada nos primeiros três dias e sua produção varia bastante de mulher para mulher. Fornece cerca de 60 calorias/dL contra as 71 fornecidas pelo leite maduro, mas é mais rico em fatores de defesa, proteínas, sódio, cloreto e vitaminas lipossolúveis, como as vitaminas A e E, e os carotenóides. Comparativamente ao leite maduro apresenta teores mais baixos de gordura, lactose e vitaminas hidrossolúveis (WORTHINGTON, 1986).

O suprimento de β -caroteno proporcionado pelo colostro não difere entre mães de recém nascidos a termo e pretermo, sendo que este alimento incrementa significativamente as taxas séricas do carotenóide no neonato (OSTREA et al., 1986). Em estudo sobre a influência da alimentação e dos suplementos vitamínicos no estado de vitamina A do RNPT foram observados teores mais elevados de retinol, RBP e pré-albumina nos neonatos alimentados com colostro comparados àqueles alimentados parenteralmente, embora a oferta teórica de retinol fosse maior via parenteral (WOODRUFF et al., 1986).

De acordo com as últimas recomendações disponíveis para vitamina A, a necessidade do RNPT seria de aproximadamente 420 ER/dia. Os RNPT doentes recebendo retinol intravenoso, requerem menos que as recomendações entéricas, aproximadamente 100 μ g de palmitato de retinol /kg/dia (NEU et al., 1990).

3-MATERIAL E MÉTODOS

O projeto desta pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Tocoginecologia/CAISM da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

A coleta de dados foi realizada no Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da UNICAMP, no período de fevereiro a maio de 1992. Participaram do estudo todas as mães de neonatos internados no Serviço de Neonatologia do CAISM, que se enquadraram dentro dos critérios de seleção abaixo especificados e que se dispuseram a participar do estudo.

No grupo de mães selecionado foram realizados, durante a internação, os seguintes procedimentos: 1. coleta de sangue, 2. coleta de colostro, 3. aplicação de inquérito nutricional e 4. coleta de material para o teste do ICCO.

3.1. Amostragem

Foram selecionadas 10 mães de RNPT (gestação inferior a 34 semanas) que apresentaram produção de colostro suficiente (24 a 36 horas após o parto) e que se dispuseram, após esclarecimentos quanto ao objetivo da pesquisa e aos procedimentos necessários, a participar do estudo voluntariamente. Foi considerada a idade gestacional descrita em prontuário, determinada pelo médico, conforme procedimento de rotina do serviço, utilizando o método clínico de CAPURRO et

al. (1978).

3.2. Coleta de material

Todas as coletas (sangue, ICCO, questionários, colostro) foram realizadas entre o primeiro e terceiro dia pós-parto, após consentimento escrito da puérpera e respeitando os princípios éticos da Declaração de Helsink, que regulariza a investigação biomédica em seres humanos.

ICCO: o material foi coletado dos dois olhos de cada puérpera, conforme técnica descrita no item 3.3.3.

Sangue: foram coletados, em tubos Vacutainer, 8,0 ml de sangue de cada puérpera em jejum e os tubos foram transportados envoltos em papel alumínio, até o laboratório. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado (2500 rpm por 15 minutos) e os soros armazenados em tubos de polipropileno tipo eppendorf (1,5 mL), em gelo seco, até análise.

Dados nutricionais e pessoais: foi aplicado inquérito nutricional composto de dados gerais da puérpera e de seu conceito e de questionário de frequência alimentar (anexos 1 e 2) em cada uma das participantes.

Colostro: foi empregada conduta padronizada realizando-se expressão manual completa de ambas as mamas a cada três horas (com maior espaçamento durante a noite), conforme procedimento usual do Serviço de Neonatologia. As ordenhas foram realizadas pela própria nutriz ou pela pesquisadora (em caso de dificuldade por parte da mãe) e o colostro armazenado a 4°C, em frascos esterilizados. Durante um período de 24 horas foram retiradas alíquotas de 10% do volume total de cada ordenha e a soma das alíquotas de todo o período compôs um "pool" homogêneo que foi armazenado em tubo Pirex e estocado em gelo

seco até análise. Quando o volume obtido em determinada ordenha não era suficiente à alimentação do RNPT e à coleta para a pesquisa, não era retirada a alíquota do estudo e perdia-se aquela amostra e a participante.

3.3. Técnicas empregadas

3.3.1- Análise de retinol e carotenóides em colostro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Em função da instabilidade dos compostos analisados, foram tomadas as devidas precauções, visando evitar a degradação dos mesmos e o comprometimento dos resultados. Toda a manipulação foi realizada à meia-luz, utilizando-se vidraria envolta em papel-alumínio, controlando-se a temperatura e em atmosfera de nitrogênio, sempre que necessário. A saponificação-extração foi realizada segundo PATTON et al. (1990) adaptada conforme o seguinte esquema:

alíquota de 2 mL de colostro
(descongelada e sonicada)

-adição de 2,5 mL de etanol e 1,5 mL de solução aquosa de KOH 50% (p/p)

-aquecimento da mistura a 45°C sob atmosfera de nitrogênio (60 minutos)

-extração com três volumes de 1 mL de hexano

-evaporação do extrato (fase hexânica) com N₂

-dissolução com os padrões internos em fase móvel, acetonitrila-metanol (AcN-MeOH) 50:50

-filtração em membrana Millipore de porosidade de 0,45 µm

-injeção no cromatógrafo

Foram utilizados Sudan I (1-(fenilazo) 2-naftalenol) como padrão interno para os carotenóides (QUACKENBUSH & SMALLIDGE, 1986) e

acetato de retinila (todo-trans sintético da Sigma R 4632) como padrão interno para o retinol. As soluções de padrões internos empregadas na dissolução do extrato foram preparados semanalmente em AcN- MeOH 50:50, estocadas a -20°C em N_2 , apresentando as seguintes concentrações: Sudan I $2,0\text{ }\mu\text{g/mL}$ e acetato de retinila $0,8\text{ }\mu\text{g/mL}$. Foi acrescentado $0,5\text{ mL}$ de cada padrão ao extrato evaporado. Todas as amostras foram analisadas em duplicata (duas alíquotas de uma mesma amostra), no máximo cinco meses após a coleta. Para cada alíquota foram realizadas três injeções, o que perfazia um total de seis corridas para cada amostra.

-Condições cromatográficas:

O extrato foi injetado em cromatógrafo líquido marca Varian constituído de um sistema de bombeamento de solvente múltiplo modelo 910 e munido de injetor manual Rheodyne modelo 7161 e alça de amostragem de $50\text{ }\mu\text{l}$ de capacidade. Todos os reagentes utilizados foram Licrosolv (Merck), filtrados em membranas de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e desgaseificados em ultrassom. Foi utilizada coluna de fase reversa tipo Econosphere C-18 $5\text{ }\mu$ Cartridge ($150 \times 4,5\text{ i.d.mm}$) da Alltech, munida com coluna de guarda Adsorbosphere C-18 $5\text{ }\mu$ Cartridge também da Alltech. O extrato foi eluído isocraticamente em fase móvel composta de acetonitrila e metanol (50:50), a uma vazão de 2 mL/min para análise dos carotenóides e 1 mL/min para o retinol. Os componentes da amostra foram detectados em detector UV/visível da Intralab modelo 5100, com lâmpadas de deutério e tungstênio, operando no comprimento de onda de 470 nm e com sensibilidade de $0,02\text{ AUFS}$ para a leitura dos carotenóides e a 325 nm e com sensibilidade de $0,08\text{ AUFS}$ para leitura de retinol. O integrador-registrador utilizado foi da marca Varian modelo 4400. Para adaptação da metodologia existente às condições operacionais do laboratório, foram testadas previamente três colunas (uma coluna RP-18 $5\text{ }\mu$ da Merck e duas colunas C-18 $5\text{ }\mu$ da Alltech) e vinte e uma combinações de fases móveis.

Para quantificação foram utilizadas curvas de calibração que

relacionaram as áreas de diferentes concentrações de cada carotenóide e do retinol com área fixa de seu respectivo padrão interno. Foram utilizados padrões cristalinos da Roche de β -criptoxantina, licopeno, α e β -caroteno e de retinol (RO I-4955). Os padrões de carotenóides foram previamente purificados através de cromatografia de coluna aberta em alúmina. Imediatamente após, eles foram identificados e quantificados espectrofotometricamente através do espectro característico de absorção, da absorbância máxima e do coeficiente de extinção específico de cada composto, utilizando espectrofotômetro Beckman modelo DU 70 UV/ visível. Os padrões foram então injetados no cromatógrafo, nas condições de trabalho para a amostra, e identificados os picos e os tempos de retenção de cada composto. Para checagem do comportamento destes compostos na amostra foram adicionadas quantidades conhecidas dos padrões às amostras e confirmados os tempos de retenção e a recuperação dos mesmos.

3.3.2. Análise de retinol em soro por CLAE

A extração do retinol foi realizada segundo BIERI *et al.* (1979), metodologia recomendada pelo IVACG (ARROYAVE *et al.*, 1982), adaptado conforme o seguinte esquema:

200 μ l de soro descongelado

- adição de 200 μ l de acetato de retinila - padrão interno (solução de etanol 0,48 μ g/mL).
- agitação da mistura em vortex por 10 segundos
- adição de 240 μ l de hexano
- agitação da mistura em vortex por 45 segundos
- sedimentação em centrífuga refrigerada a 3000 rpm por 5 min
- coleta de 150 μ l do extrato
- evaporação do extrato sob atmosfera de nitrogênio
- dissolução em 100 μ l de metanol
- injeção no cromatógrafo

Foi utilizada a mesma aparelhagem descrita para a cromatografia dos componentes do colostro, com a alteração de algumas condições cromatográficas. O extrato foi eluído isocraticamente em fase móvel constituída de metanol/água (95:5), a uma vazão de 1 mL/min, passando por uma alça de amostragem de 10 μ l de capacidade. O detector operou a 325 nm, com atenuação de 0,04 AUFS. Todas as amostras foram injetadas com micro seringa Hamilton de 100 μ l, em duplicata, dentro de um período de cinco meses. Para a quantificação do retinol foi utilizada a curva de calibração construída com diferentes concentrações de retinol para uma concentração fixa de padrão interno (0,48 μ g/mL).

3.3.3. Teste de impressão citológica da conjuntiva ocular (ICCO)

Este teste é baseado na redução do número das células caliciformes e em alterações morfológicas das células epiteliais da conjuntiva bulbar (WITTPENN *et al.*, 1987; AMEDEE-MANESME *et al.*, 1988). O teste é realizado pressionando-se uma fita de papel de filtro de acetato de celulose (Millipore HAWO 304, 25 x 5 mm) sobre a conjuntiva bulbar temporal por três a cinco segundos. Em seguida uma parte das células contida no papel é transferida para uma lâmina que é fixada e corada segundo técnica proposta por LUZEAU *et al.* (1988). O papel é também fixado, corado pela técnica de Harris Schorr, desidratado em álcool e tornado transparente no xileno segundo técnica proposta no manual técnico do grupo de WITTPENN *et al.* (1988). Ambos são lidos ao microscópio óptico. O diagnóstico definitivo de HA é estabelecido, segundo os critérios sugeridos no referido manual, somente quando esta deficiência for constatada nos dois olhos, por dois examinadores independentes.

3.3.4. Inquérito nutricional

O inquérito nutricional era composto de dados gerais da

nutriz e de seu conceito e de um questionário de frequência alimentar mensal, avaliando consumo de alimentos fontes de vitamina e pró-vitamina A. Os dados pessoais e obstétricos, assim como os do recém nascido, foram obtidos através de consulta ao prontuário de internação e checados com as puérperas. Os dados sócio-econômicos foram obtidos através de questionamento direto assim como os dados relativos ao consumo de álcool, fumo e suplemento vitamínico. A renda da nutriz foi calculada através da conversão dos rendimentos totais da família em salários mínimos (vigentes na época) e posterior divisão deste montante pelo número de pessoas vivendo com a referida renda. Obteve-se, portanto, um valor em salário mínimo (SM) per capita. Os dados nutricionais propriamente ditos foram obtidos através do questionamento das puérperas a respeito do consumo de alimentos-fonte de vitamina A, no último mês de gestação. A seleção dos alimentos listados no questionário baseou-se nos dados do Estudo Nacional de Despesa Familiar (FIBGE-ENDEF, 1978) sobre o consumo alimentar no Estado de São Paulo e no trabalho de RONCADA & MAZZILLI (1989) que avaliou o consumo de vitamina A de comunidades paulistas. Foram listados todos os alimentos que contribuíam significativamente para a ingestão de vitamina A seja pela frequência de consumo seja pelo elevado teor de vitamina A do alimento. Foi feito o detalhamento quanto à frequência de consumo, o porcionamento em medidas caseiras e a forma de preparo dos alimentos.

O cálculo dos nutrientes foi obtido através de utilização de programa computadorizado de cálculo de dietas desenvolvido pelo Serviço de Informática em Saúde da Escola Paulista de Medicina (SIS-EPM). Foram realizadas alterações quanto aos valores de pró-vitamina A de alguns vegetais locais, segundo dados de RAMOS & RODRIGUEZ-AMAYA (1987), quais sejam: salsa, couve, chicória, alface, rúcula, agrião, almeirão e repolho e a valores de alguns alimentos de origem animal (fígado, manteiga e margarina) cujos valores do programa apresentavam-se muito discrepantes dos registrados na tabela do FIBGE-ENDEF (1985).

3.4. Análise estatística dos dados

Foram empregadas análises estatísticas descritivas como o cálculo de médias e desvios padrão ($\bar{X} \pm DP$). Para a correlação dos dados sérico, dietéticos e lácteos de vitamina A foi empregada a correlação de Pearson (SNEDEW & COCHRAN, 1967).

4-RESULTADOS

4.1 Amostra

Foram internados trinta e oito RNPT (IG < 34 semanas) no Serviço de Neonatologia do CAISM, no período de fevereiro a maio de 1992. Deste total uma criança foi transferida do hospital, outra recebeu alta a pedido e sete foram a óbito até dois dias após o parto, resultando em vinte e nove mães com os requisitos necessários à inclusão na amostra, no referido período. Todas as puérperas contactadas se dispuseram a participar do estudo. Ocorreram perdas significativas neste grupo em função dos seguintes fatores: pequena produção de colostro (insuficiente à alimentação do RN e à coleta) por parte de dez mulheres (34,5 % do total de mães), falhas na coleta do colostro (três amostras - 10,5 %) e de sangue (duas amostras - 7%) e não contactuação com quatro das puérperas (14 %). Foram, portanto, obtidos todos os dados e o colostro adequadamente coletado de dez mães (34,5 % do total de RNPT internados).

As Tabelas 1 e 2 apresentam a caracterização das mães e de seus respectivos conceitos. A idade materna variou de 17 a 42 anos sendo a média de 27 ± 7 anos. Apenas duas das mulheres eram primíparas enquanto que as demais possuíam no máximo três filhos. Das multíparas, todas haviam amamentado pelo menos um dos filhos e possuíam alguma experiência com relação à amamentação. Uma das mulheres gerou um casal de gêmeos o que resultou em um grupo de onze RNPT para dez mães. Seis das mulheres (60%) eram brancas enquanto que uma (10%) era parda e

Tabela 1: Caracterização do grupo de 10 mães de recém nascidos pretermo, atendidas no CAISM fev./maio, 1992

MÃES	IDADE .(anos)	COR	PARIDADE	ESCOLARIDADE **	RENDA (salário-mínimo per capita)
1	42	branca	4	CC	0,8
2	25	negra	1	SC	4,7
3	26	branca	2	PI	sem noção
4	30	branca	3	GI	0,6
5	31	branca	3	GI	0,7
6	17	negra	2	PI	0,7
7	22	negra	4	PI	0,9
8	19	branca	1	GI	5,2
9	26	parda	3	PI	0,6
10	28	parda	3	PI	0,8
MÉDIA ($\bar{X} \pm DP$)	27 $\pm$ 7		3 $\pm$ 1		2 $\pm$ 2

** PI primário incompleto
 GI ginásio incompleto
 CC colegial completo
 SC superior completo

Tabela 2: Caracterização do grupo de 11 recém nascidos pretermo (RNPT) internados no Serviço de Neonatologia do CAISM fev./mai, 1992

RNPT	SEXO *	IDADE GESTACIONAL **	ADEQUAÇÃO ***	PESO gramas	ESTATURA cent metros
1	F	33S	PIG	1400	39,0
2	M	32S 6D	AIG	1850	43,0
3	M	30S 6D	PIG	1030	36,0
4	M	32S 1D	AIG	1620	41,0
5	F	32S 3D	PIG	850	32,5
6	M	32S 1D	AIG	1550	40,0
7	M	32S 3D	AIG	1590	42,0
8	F	32S 3D	AIG	1920	45,5
9	M	32S 3D	AIG	1610	41,5
	M	32S 3D	AIG	1600	42,0
10	F	32S 3D	AIG	2160	44,0

* F feminino M masculino

** S semanas D dias

*** PIG pequeno para a idade gestacional
AIG adequado para a idade gestacional

três (30%) eram negras. A escolaridade no grupo variou de primário incompleto ao superior completo, sendo que 50% das mulheres possuía primário incompleto, 30% ginásio incompleto, 10% colegial completo e 10% superior completo. A maioria das mulheres (70%) apresentava renda inferior a um salário mínimo per capita/mês. Apenas 20% do grupo referiu renda superior a dois salários mínimos per capita/mês e uma das puérperas (10%) não soube informar a renda familiar. Durante a gestação, três das mulheres (30%) mantiveram o consumo diário de cigarros e nenhuma referiu consumo de bebidas alcóolicas ou suplemento medicamentoso de vitamina A.

No grupo de onze crianças, quatro (36%) eram do sexo feminino e sete (64%) do sexo masculino. A idade gestacional média foi de trinta e duas semanas e três dias. Oito dos RNPT (73%) eram adequados e três (27%) pequenos para a idade gestacional. O peso e a estatura das crianças variou largamente em função da idade gestacional e de peculiaridades da prematuridade (Tabela 2).

4.2 Avaliação dos teores de vitamina A e carotenóides

4.2.1. Dieta

O consumo estimado de vitamina A em equivalentes de retinol (1 ER = 1 μ g de retinol) variou de 527 a 1376 ER /dia, resultando em uma ingestão média de 781 ± 247 ER /dia. Deste total $32,9 \pm 20,6\%$ correspondeu a vitamina A pré-formada de alimentos de origem animal e $67,2 \pm 20,6\%$ a fontes de origem vegetal, conforme listado na Tabela 3.

4.2.2. Soro

A concentração média de vitamina A sérica do grupo de mães estudado foi de 23 ± 8 μ g/dL, variando de 14 a 36 μ g/dL conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 3: Consumo estimado de vitamina A (VA) em equivalentes de retinol/dia (ER/dia) das 10 gestantes, avaliado através de questionário seletivo de frequência alimentar

Gestante	Consumo Total VA (ER/dia)	Fonte Animal		Fonte Vegetal	
		ER	%	ER	%
1	862	250	29	612	71
2	961	130	14	831	86
3	674	70	10	603	90
4	1376	713	52	662	48
5	760	207	27	553	73
6	641	56	9	586	91
7	553	206	37	347	63
8	713	230	32	483	68
9	527	219	42	308	58
10	742	566	76	176	24
MÉDIA ($\bar{X} \pm DP$) ER/dia		781 $\pm$ 247		265 $\pm$ 211	
				516 $\pm$ 192	

Tabela 4: Teores de vitamina A (VA) no soro, na dieta e no colostro de 10 mães de RNPT

NUTRIZ	VA SORO $\mu\text{g} / \text{dL}$	VA DIETA ER/dia	VA COLOSTRO $\mu\text{g}/\text{dL}$
1	20	862	85
2	34	961	75
3	18	674	37
4	14	1376	126
5	20	760	43
6	19	641	64
7	36	553	46
8	21	713	33
9	31	527	161
10	14	742	38
MÉDIA ($\bar{X} \pm \text{DP}$)	23 ± 8	781 ± 247	71 ± 43

ER equivalentes de retinol

As análises foram realizadas em duplicata e apresentaram coeficientes de variação inferior a 5%. O tempo de retenção foi de 3,8 min para o retinol e de 5,6 min para o acetato de retinila (padrão interno) utilizando fase móvel composta de metanol e água (95:5) a um fluxo de 1 mL/min. A Figura 3 apresenta um cromatograma típico.

A recuperação do retinol adicionado a "pool" de soro (irradiado com lâmpada ultra-violeta por três horas) em cinco diferentes concentrações (de 10 a 76 $\mu\text{g/mL}$) foi de $94,2 \pm 3,6\%$ (variando de 90 a 98%).

Entre o 15^o e 20^o dia pós-parto, foi possível a coleta de sangue de algumas das nutrízes (40%) que participavam do estudo. Embora não fosse possível nenhum tratamento estatístico, observa-se tendência de aumento dos teores séricos nesta fase, quando compara-se com os valores de retinol apresentados por estas mesmas mulheres no puerpério (Tabela 5).

4.2.3. Colostro

Os teores de vitamina A, α e β -caroteno, β -criptoxantina e licopeno dos leites analisados estão listadas na Tabela 6.

Todas as análises foram realizadas em duplicata. Para a análise do retinol foi registrado coeficiente de variação de 5 %. Os tempos de retenção foram de 2,8 min e 3,2 min para retinol e acetato de retinila respectivamente, tendo o extrato sido eluído em fase móvel composta de acetonitrila e metanol (50:50) com fluxo de 1 mL/min e lido a 325 nm. A recuperação do retinol adicionado a "pool" de colostro em três diferentes concentrações foi de $96 \pm 4 \%$ (de 92 a 102%). A Figura 4 apresenta um cromatograma típico.

Para a análise dos carotenóides foram registrados coeficiente de variação de 6% para β -criptoxantina, 7% para α e

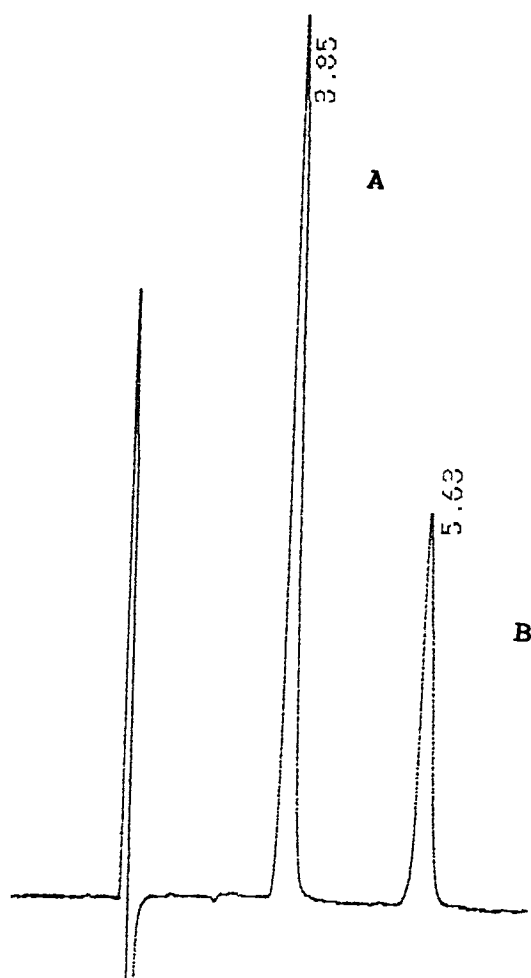


FIGURA 03: Cromatograma, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, típico do retinol (A) e acetato de retinila -padrão interno (B) para uma amostra de soro. Condições cromatográficas: coluna C-18 5 μ , fase móvel composta de metanol e água (95:5), fluxo de 1 mL/min e leitura a 325 nm.

Tabela 5: Comparação do teor do retinol sérico, de quatro das mães estudadas, coletado em diferentes períodos

NUTRIZ	1 ^a COLETA *	2 ^a COLETA **
1	20	31
2	14	35
3	20	31
4	31	49
MÉDIA (X ± DP)	21 ± 7	37 ± 9

- valores médios de duplicatas

* período puerperal

** 15 dias após o parto

Tabela 6: Teores de retinol e carotenóides ($\mu\text{g/dL}$) do colostro de 10 mães de RNPT

NUTRIZ	COLOSTRO *				
	RETINOL	β -CRIPTO	LICOPENO	β -CAROT	A-CAROT
1	85	11	17	10	3
2	75	6	17	8	tr
3	37	2	7	3	nd
4	126	1	18	3	nd
5	43	2	3	3	nd
6	64	4	4	6	3
7	46	2	4	4	nd
8	33	2	2	tr	nd
9	161	46	41	11	nd
10	38	3	11	8	nd
MÉDIA ($\bar{X} \pm \text{DP}$)	71 $\pm$ 43	8 $\pm$ 14	12 $\pm$ 12	6 $\pm$ 4	

* valores médios de duplicatas

tr - traços

nd - não determinado

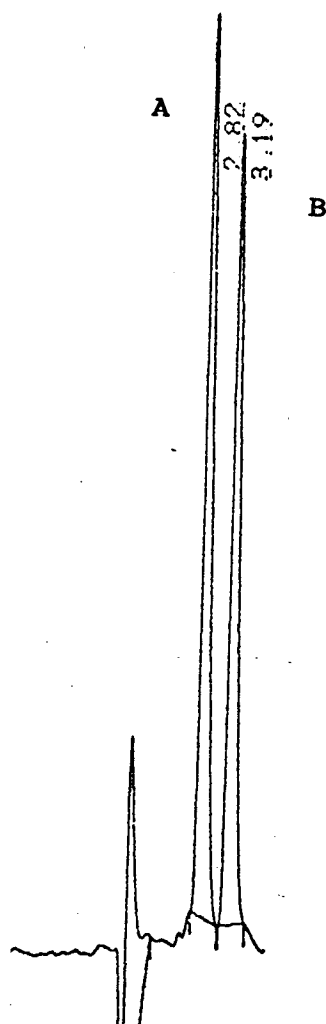


FIGURA 04: Cromatograma, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, típico do retinol (A) e acetato de retinila -padrão interno (B) para uma amostra de colostro. Condições cromatográficas: coluna C-18 5 μ , fase móvel composta de acetonitrila e metanol (50:50), fluxo de 1 mL/min e leitura a 325 nm.

β -caroteno e 11% para o licopeno. Os tempos de retenção foram de 3,8 min para β -criptoxantina, 6,0 para o licopeno, 8,7 para o α -caroteno e 9,4 min para o β -caroteno. O padrão interno (Sudan I) apresentou tempo de retenção de 1,36 min, sendo o extrato eluído a fluxo de 2 mL/min e lido a 470 nm. A Figura 5 apresenta um cromatograma típico.

A recuperação dos quatro carotenóides foi testada adicionando-se quantidades conhecidas dos mesmos (em concentrações que incluíam as dosadas nesse estudo) a "pool" de colostro. Para β -criptoxantina, α e β -caroteno a recuperação variou na faixa de 93 a 104 %, enquanto que para o licopeno a recuperação média foi de 84%.

Quatro das mães estudadas ainda encontravam-se alojadas na casa de repouso, 15 dias após o parto, e consentiram a repetição dos mesmos exames e inquéritos realizados no período puerperal. A presença das mães no hospital era condição imprescindível para a nova coleta de 24 horas, desta vez de leite maduro. Os teores de vitamina A e dos carotenóides apresentadas pelo grupo foram de: $43 \pm 17 \mu\text{g/dL}$ para o retinol, 2 ± 1 para a β -criptoxantina, 2 ± 2 para o licopeno e 3 ± 3 para o β -caroteno. Apesar da reduzida amostragem, pode-se observar a diferença de composição dos leites de dois estágios de lactação com relação a vitamina A e aos carotenóides (Tabela 7).

As curvas de calibração utilizadas neste estudo e suas respectivas equações da reta são apresentadas nas Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11. Todas as curvas apresentaram linearidade, passaram na origem ou muito próximo dela e continham os valores dosados.

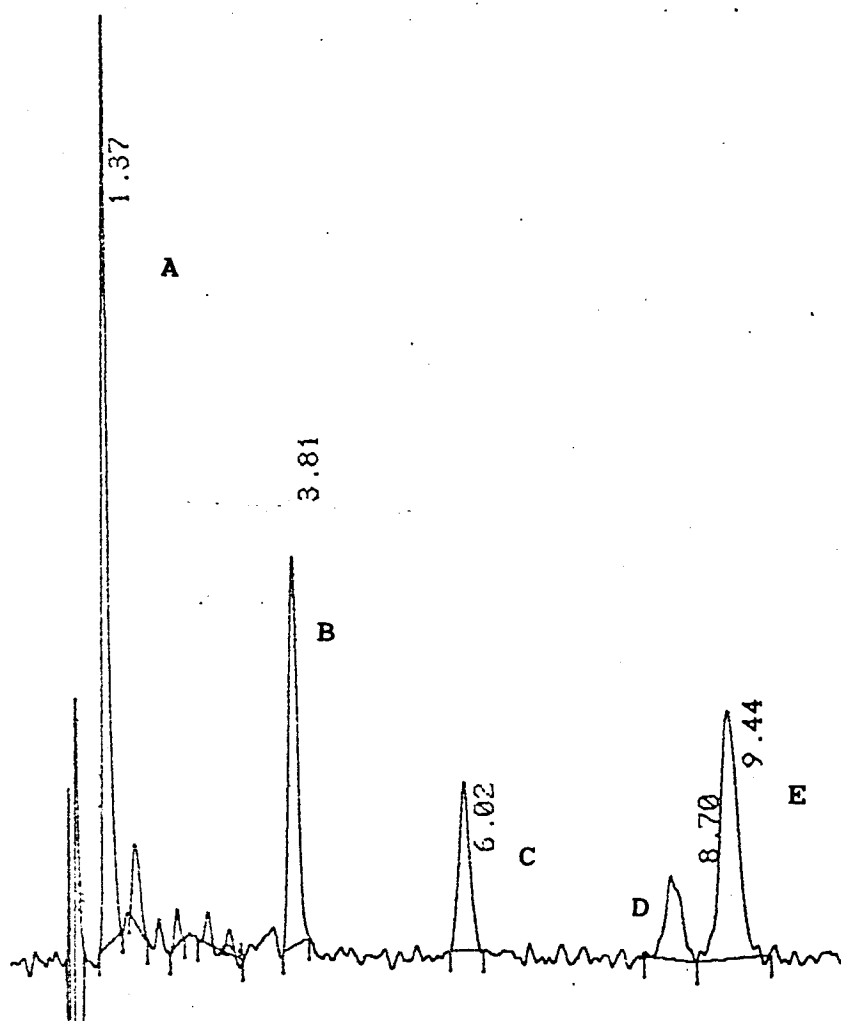


FIGURA 05: Cromatograma, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, típico para Sudan I-padrão interno (A), β -criptoxantina (B), licopeno (C), α -caroteno (D) e β -caroteno (E) em colostro. Condições cromatográficas: coluna C-18 5 μ , fase móvel composta de acetonitrila e metanol (50:50), fluxo de 2 mL/min e leitura a 470 nm.

Tabela 7: Composição do colostro e do leite de 4 mães com relação a retinol, licopeno, β -criptoxantina e β -caroteno ($\mu\text{g/dL}$)

	COLOSTRO	LEITE MADURO *
RETINOL	85	37
	126	60
	43	54
	161	22
MÉDIA ($\bar{X} \pm \text{DP}$)	104 $\pm$ 51	43 $\pm$ 17
β -CRIPTOX	11	2
	1	tr
	2	2
	46	3
MÉDIA ($\bar{X} \pm \text{DP}$)	15 $\pm$ 21	2 $\pm$ 1
LICOPENO	17	tr
	18	5
	3	1
	41	tr
MÉDIA ($\bar{X} \pm \text{DP}$)	20 $\pm$ 16	2 $\pm$ 2
β -CAROTENO	10	7
	3	3
	3	tr
	11	tr
MÉDIA ($\bar{X} \pm \text{DP}$)	7 $\pm$ 4	3 $\pm$ 3

tr - traços

* valores médios de duplicatas

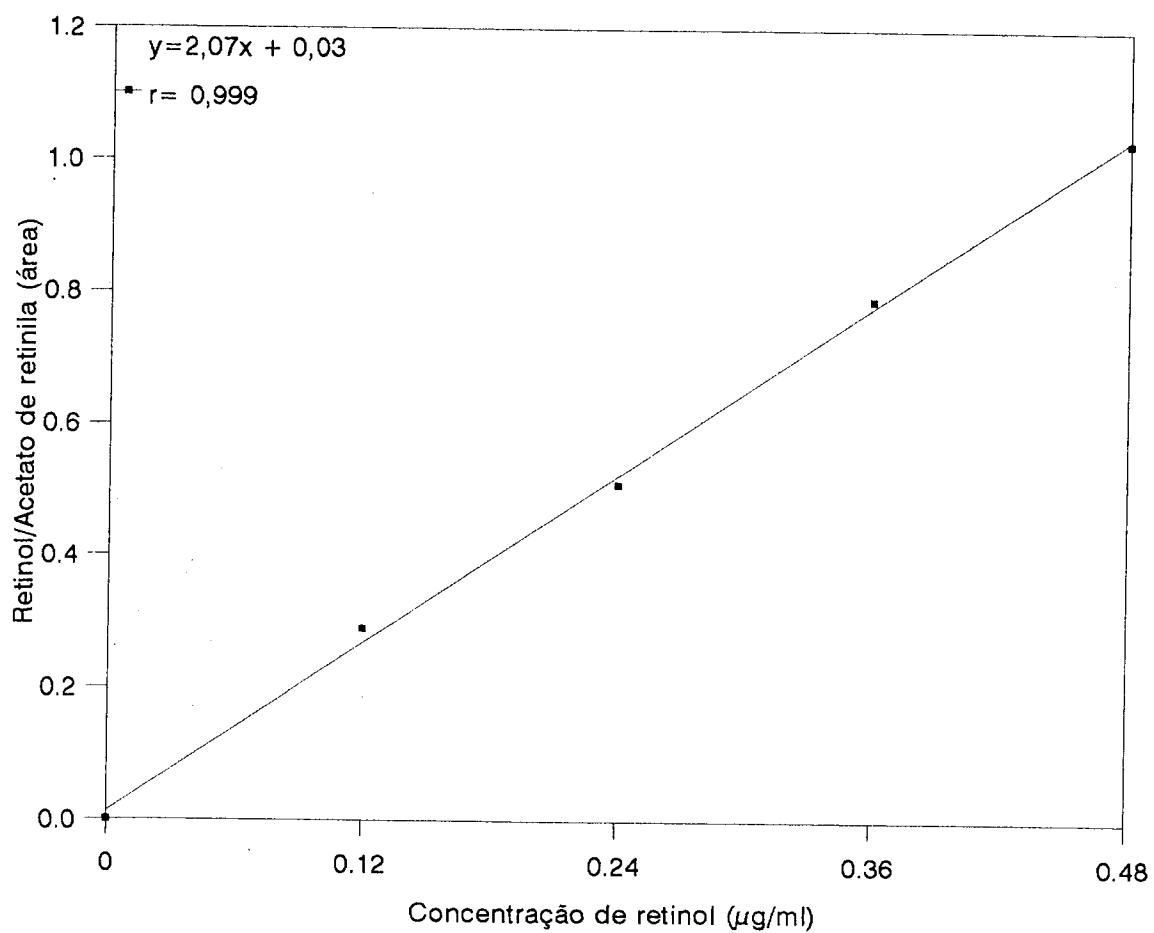


FIGURA 06: Curva de calibração para retinol utilizando acetato de retinila como padrão interno (soro). Cada ponto corresponde a duas alíquotas, com três injeções para cada alíquota.

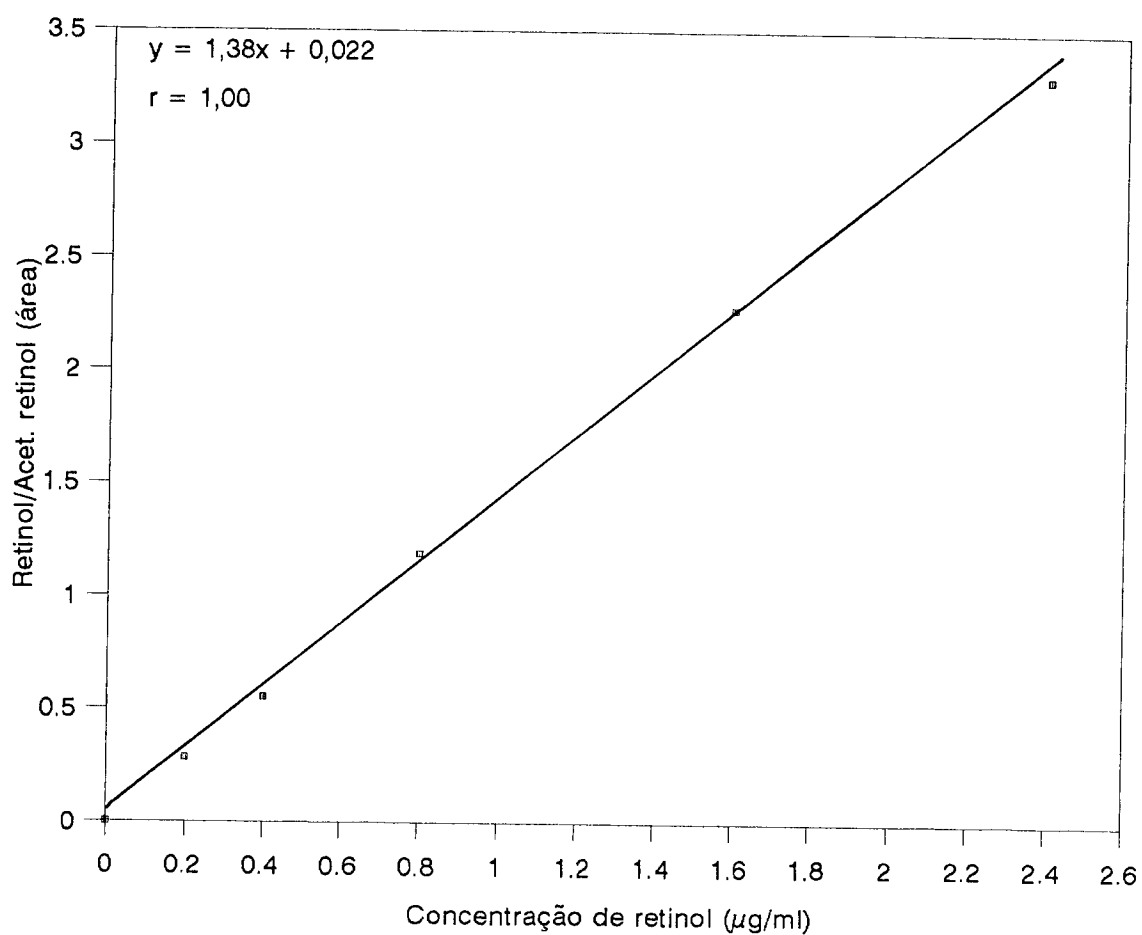


FIGURA 07: Curva de calibração para retinol utilizando acetato de retinila como padrão interno (colostro). Cada ponto corresponde a duas alíquotas, com três injeções para cada alíquota.

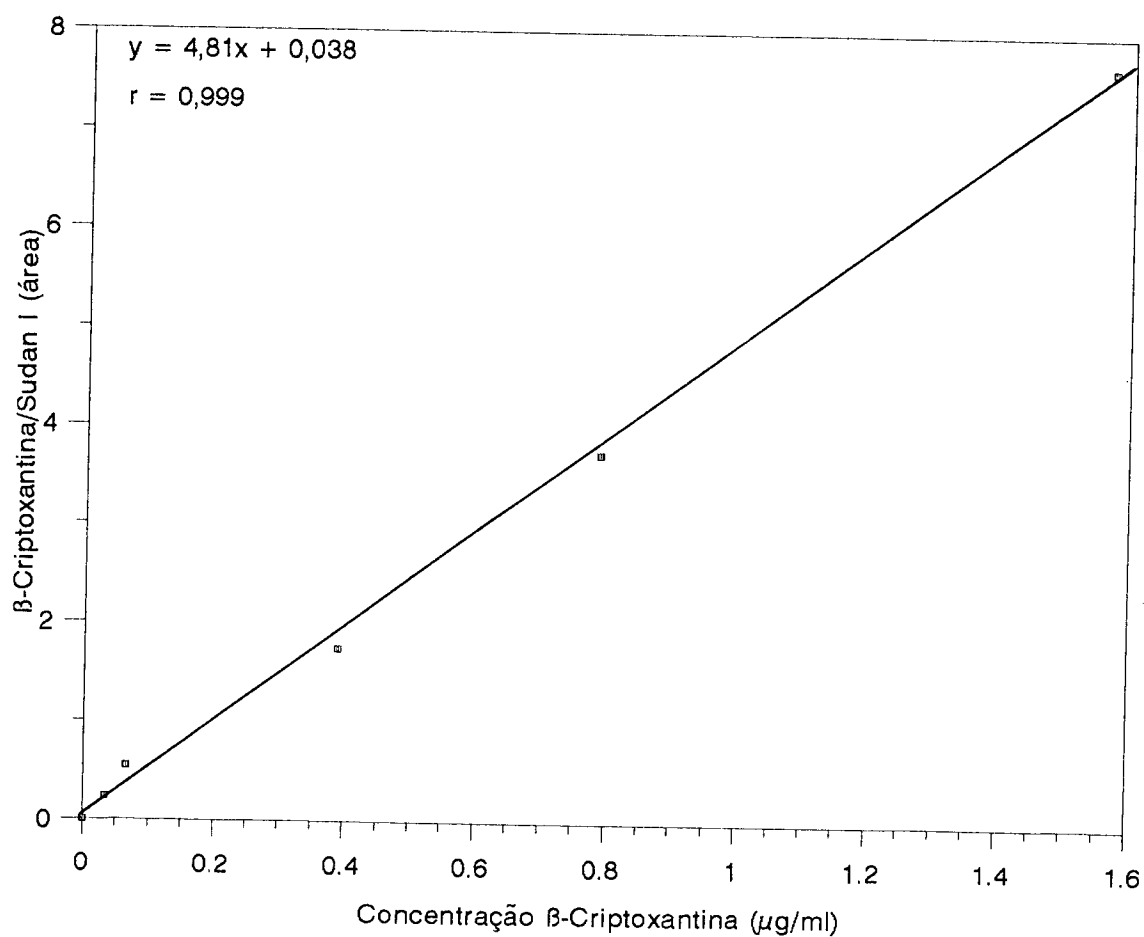


FIGURA 08: Curva de calibração para β -criptoxantina utilizando Sudan I como padrão interno (colostro). Cada ponto corresponde a duas alíquotas, com três injeções para cada alíquota.

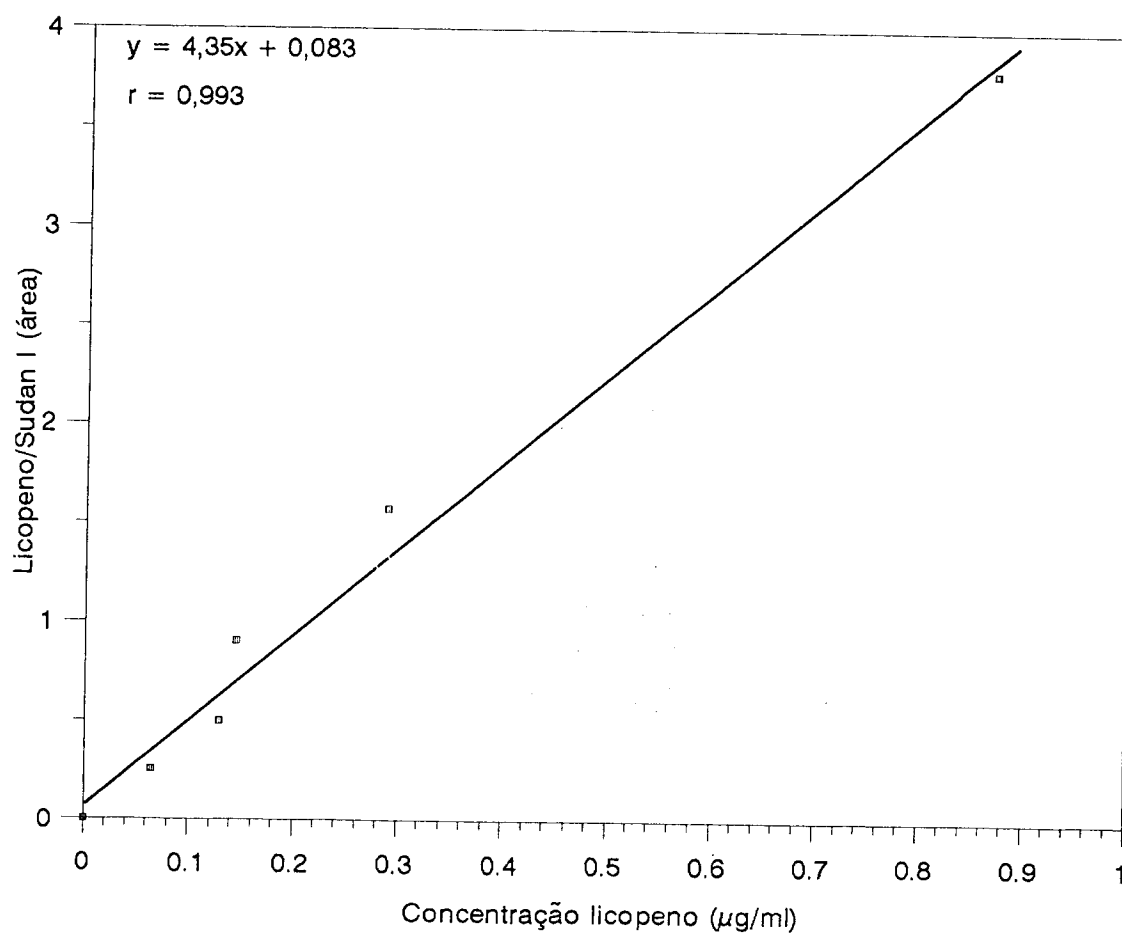


FIGURA 09: Curva de calibração para licopeno utilizando Sudan I como padrão interno (colostro). Cada ponto corresponde a duas alíquotas, com três injeções para cada alíquota.

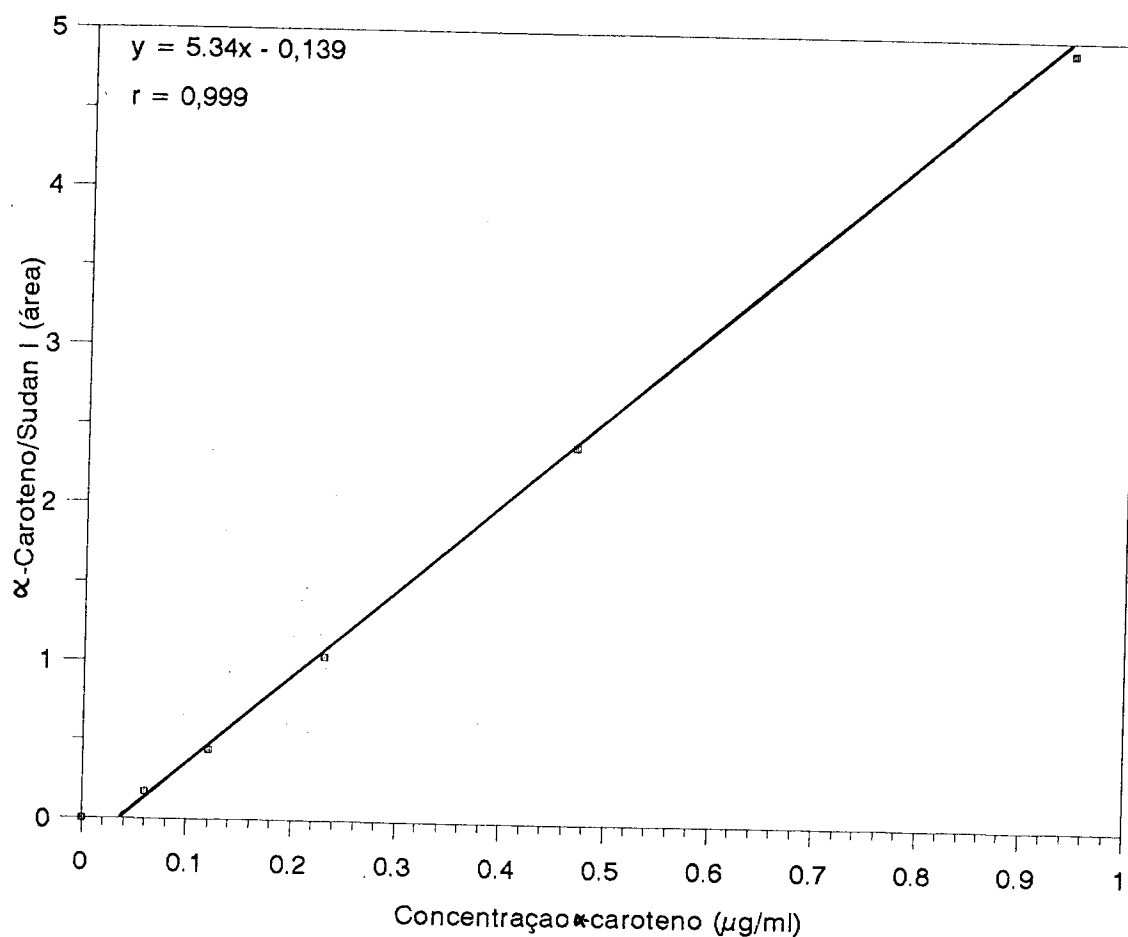


FIGURA 10: Curva de calibração para α -caroteno utilizando Sudan I como padrão interno (colostro). Cada ponto corresponde a duas alíquotas, com três injeções para cada alíquota.

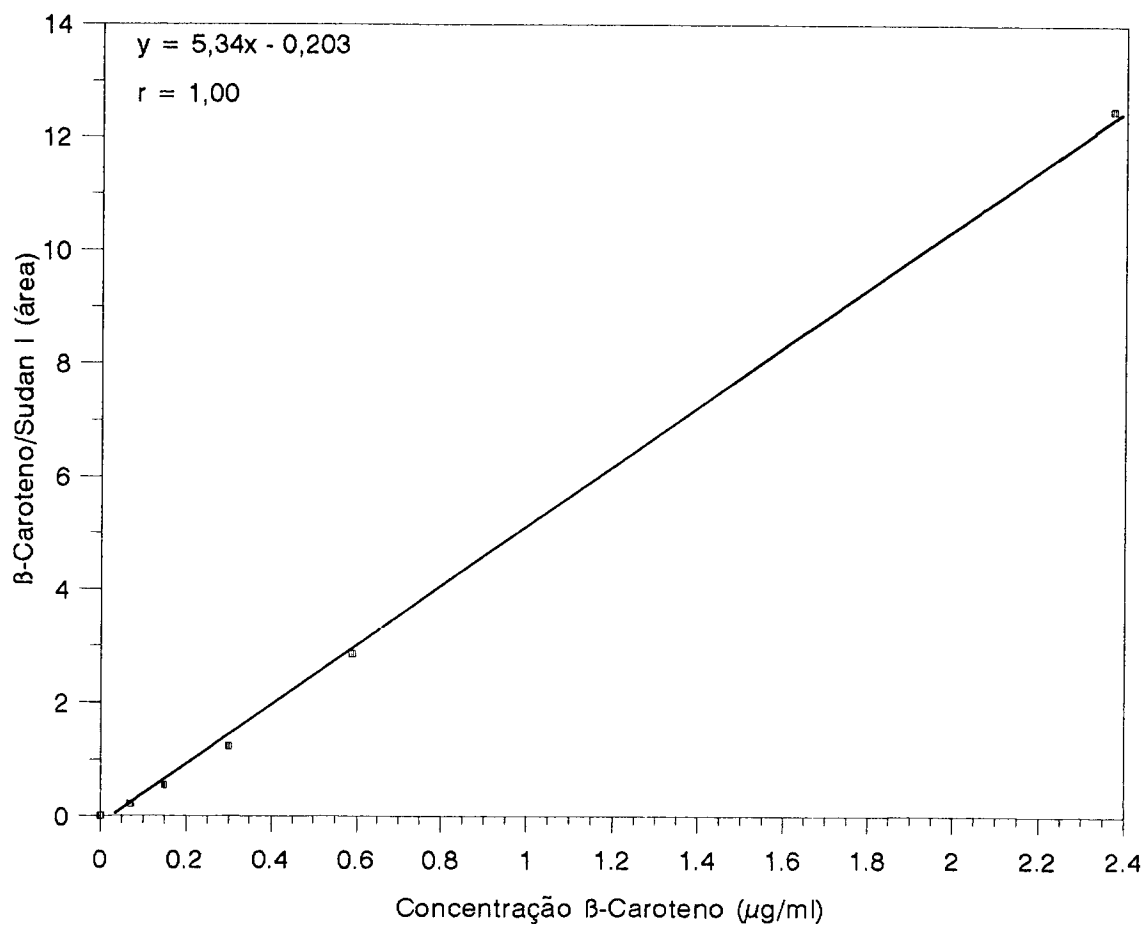


FIGURA 11: Curva de calibração para β -caroteno utilizando Sudan I como padrão interno (colostro). Cada ponto corresponde a duas alíquotas, com três injeções para cada alíquota.

4.3 Impressão citológica da conjuntiva ocular (ICCO)

Para todas as mulheres foram avaliados os papéis de filtro e os "imprints" em lâminas do material citológico coletado. Nenhuma delas apresentou carência de células caliciformes ou alterações de células epiteliais que caracterizassem quadro de deficiência de vitamina A, por este método.

4.4 Correlações

Apesar da reduzida amostragem, testou-se a correlação dos teores séricos, dietéticos e lácteos de retinol, através da correlação de Pearson. Não foi constatada correlação entre as referidas variáveis considerando-se nível crítico de 5 % ($p < 0,05$).

5-DISCUSSÃO

Os colostros coletados de dez mães (multíparas e primíparas) de RNPT (IG < 34 semanas) pequenos e adequados para a idade gestacional, internados no Serviço de Neonatologia do CAISM entre fevereiro e maio de 1992, apresentaram grande variação entre as diferentes doadoras com relação aos teores de retinol e carotenóides (Tabela 6). Esta variação tem também sido observada em outros estudos (PATTON *et al.*, 1990 ; KIM *et al.*, 1990) e relacionada a variações nos intervalos de tempo entre o parto e a coleta do leite assim como a diferenças na composição da dieta, entre outros fatores.

Na análise de alimentos, os carotenóides eram tradicionalmente estudados "em grupo". As metodologias empregadas limitavam a expressão do resultado em "caroteno total", designação que engloba todos os compostos com absorvidade em um dado comprimento de onda, geralmente 450-460 nm. Tais informações são, portanto, essencialmente qualitativas, principalmente quando se consideram as limitações das técnicas usualmente empregadas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Esta tendência é também observada na maioria dos trabalhos relativos à composição do leite materno (GEBRE-MEDHIN, *et al.* 1976; BUTTE *et al.*, 1981; GARG *et al.*, 1988).

Um dos objetivos deste estudo foi a identificação e separação dos principais carotenóides presentes no colostro humano, através de CLAE. Os carotenóides são compostos muito instáveis cuja manipulação exige uma série de cuidados, como os empregados neste estudo. Em

função das características químicas e físico-químicas destes compostos, pode ocorrer degradação, formação de isômeros e rearranjos estruturais (SCOTT, 1992). Segundo QUACHENBUSH & SMALLIDGE (1986), mesmo os padrões de carotenóides comerciais disponíveis (dos seis maiores laboratórios de produtos químicos e bioquímicos) apresentam diferentes graus de pureza. Os padrões comerciais de β -caroteno estudados por esses autores apresentaram percentagens de pureza que variaram de 0,6 a 88,7 % para produtos de diferentes laboratórios (fornecedores) e de 23 a 81 % entre padrões de um mesmo laboratório. É, portanto, indispensável a prévia purificação dos padrões e a utilização dos mesmos imediatamente após este procedimento, mesmo quando observadas todas as precauções com relação à exposição a luz, oxigênio e calor. Para a quantificação de compostos com tais características, a utilização de um composto estável como padrão interno é um procedimento útil, prático e, por vezes, fundamental. A padronização externa requereria a disponibilidade constante de padrões purificados de cada um dos carotenóides e a construção, praticamente diária, das quatro curvas de calibração. Um composto é tido como adequado como padrão interno quando é estável, inerte, não faz parte da amostra, apresenta solubilidade semelhante a dos compostos analisados assim como absorve em comprimento de onda próximo, não coelui com nenhum dos compostos da amostra e, idealmente, apresenta estrutura semelhante a dos compostos a serem quantificados (QUACHENBUSH & SMALLIDGE, 1986). No caso dos carotenóides, a obtenção de um padrão interno com estrutura similar é pouco viável, principalmente em função da instabilidade de compostos com tal estrutura molecular. O 1-(fenilazo) 2 naftalenol (Sudan I), apesar de estruturalmente bastante diferente dos carotenóides, é um composto que preenche todos os demais requisitos, podendo ser utilizado como padrão interno na quantificação dos carotenóides licopeno, β -criptoxantina, α e β -caroteno em leite materno, empregando-se a metodologia anteriormente descrita. Nas condições cromatográficas empregadas, foram identificados três carotenóides precursores de vitamina A (α e β -caroteno e β -criptoxantina) e o licopeno (antioxidante natural

importante) (tabela 6).

Confirmando os achados de PATTON et al. (1990), pode-se observar que, ao contrário do que ocorre no leite de bovinos, o β -caroteno não é o carotenóide predominante no leite humano. Constatou-se também que, dentre os carotenóides observados, o α -caroteno foi o de menor concentração no leite materno.

PATTON et al. (1990) observaram que o conteúdo de "caroteno total" é significativamente diferente da soma dos teores dos diferentes carotenóides (licopeno, β -cripoxantina, α e β -caroteno) dosados por CLAE em alíquotas de uma mesma amostra de colostro. Portanto, não é possível comparar-se o valor de carotenóides totais relatados em outros estudos com a soma dos carotenóides quantificados individualmente, nesta investigação.

Em levantamento bibliográfico detalhado, foi encontrada a descrição da análise de carotenóides e retinol em colostro, por CLAE, apenas em um trabalho (PATTON et al., 1990). Os teores médios relatados por esses autores para os carotenóides foram até dez vezes maiores do que os encontrados nesse estudo, enquanto que para o retinol a diferença foi de 26% (Tabela 8). Vale ressaltar que, no presente estudo, o retinol e os carotenóides foram extraídos ao mesmo tempo, as dosagens apresentaram percentagens de recuperação adequadas e todas as amostras foram armazenadas em gelo seco por período inferior a cinco meses, levando em consideração que as alíquotas de leite se mantêm estáveis por mais de seis meses a -20° C (ARROYAVE et al., 1982; CRAFT et al., 1988). A escassez de estudos correlatos dificulta as comparações, mas um dos fatores que pode ter influenciado nestes resultados é a composição da dieta das nutrízes deste estudo e do estudo de PATTON et al. (1990). Não só o teor de vitamina A e carotenóides da dieta influi em sua utilização, mas também os teores de gordura, proteínas e antioxidantes, entre outros (DE LUCA et al., 1977). Outro fator importante que deve ser ressaltado é a forma de

Tabela 8 : Comparação dos teores médios de retinol e carotenóides ($\mu\text{g/dL}$) dosados em colostro por cromatografia líquida de alta eficiência

COMPOSTOS	Neste estudo	PATTON <i>et al.</i> (1990)
Retinol	71 ± 43	98 ± 82
Licopeno	12 ± 12	96 ± 85
β -Criptoxantina	8 ± 14	71 ± 61
β -Caroteno	6 ± 4	66 ± 76

Tabela 9: Comparação dos teores médios de retinol e carotenóides ($\mu\text{g/dL}$) dosados em leite maduro por cromatografia líquida de alta eficiência

COMPOSTO	Neste estudo	KIM <i>et al.</i> (1990)
Retinol	43 ± 17	57 ± 25
Licopeno	2 ± 2	4 ± 2
α -Caroteno	*	3 ± 1
β -Caroteno	3 ± 3	5 ± 2

* foi mensurável o teor de α -caroteno em apenas duas amostras, apresentando ter de $3 \mu\text{g/dL}$ cada

coleta do colostro para análise. No estudo de PATTON *et al.* (1990) as coletas de colostro foram realizadas, aleatoriamente, em diferentes períodos do dia, consistindo de uma única ordenha de uma mama (expressão manual ou com bomba elétrica) considerada adequada para quantificação dos nutrientes. Tal procedimento pode comprometer a qualidade dos resultados em função das variações fisiológicas da composição do leite no decorrer do dia (HYTTEN, 1954; JACKSON, 1988), durante a mamada (HALL, 1979; NEVILLE *et al.*, 1984) e de mama para mama (BROWN *et al.*, 1982; NEVILLE *et al.*, 1984). Tais variações são particularmente evidentes com relação à gordura e outros nutrientes lipossolúveis como os carotenóides e a vitamina A.

Nas amostras das quatro doadoras, de coletas proporcionais de 24 horas de leite maduro, observou-se a diminuição dos teores de vitamina A e dos carotenóides quando comparados com os teores de amostras, das mesmas mães, coletadas nos primeiros três dias de lactação (Tabela 7). Esta diferença já era esperada, sendo relatada também em outros estudos tanto para a vitamina A (GEBRE-MEDHIN *et al.*, 1976; CHAPPELL *et al.*, 1985), quanto para os carotenóides (OSTREA *et al.*, 1985; CHAPPELL *et al.*, 1985; PATTON *et al.*, 1990). O teor médio de retinol obtido para o leite "maduro" de $43 \pm 17 \mu\text{g/dL}$, encontra-se entre os valores geralmente descritos na literatura que, em condições normais, variam de 40 a 60 $\mu\text{g/dL}$ (OLSON, 1987). Os valores de licopeno e β -caroteno, embora inferiores, apresentam resultados semelhantes aos do estudo recente de KIM *et al.* (1990) utilizando CLAE, principalmente considerando-se as diferenças de consumo entre os participantes dos dois estudos (tabela 9).

Ainda com relação à composição dos leites é interessante relatar a diferença marcante de coloração entre as amostras das doadoras. O amarelado observado na maioria dos colostros é geralmente reflexo da presença de carotenóides e pôde-se constatar a associação entre a tonalidade do colostro e os teores de carotenóides. A gama de tonalidades observada foi grande assim como a variabilidade dos

teores de carotenóides dosados. Embora este seja um parâmetro visual e estritamente qualitativo, foi útil na confirmação dos valores extremos: o colostro mais alaranjado foi o que apresentou maiores taxas de carotenóides enquanto que o mais esbranquiçado as menores. As amostras de leite maduro de três das quatro doadoras apresentaram coloração mais clara que as de colostro, confirmando a diminuição dos teores encontrados através de dosagem por CLAE.

O valor médio de retinol sérico de $23 \pm 8 \mu\text{g/dL}$ (14 a 36 $\mu\text{g/dL}$) apresentado pelas puérperas estudadas foi próximo ao limite inferior para adultos normais, segundo os critérios do IVACG (ARROYAVE et al., 1982). Teores inferiores a 10 $\mu\text{g/dL}$ são indicadores importantes de deficiência de vitamina A, enquanto que a faixa de 20 a 49 $\mu\text{g/dL}$ é tida como normal. Os valores intermediários são de difícil interpretação principalmente quando se trata de um grupo peculiar como o de gestantes e puérperas. Neste grupo, valores séricos inferiores aos de mulheres não grávidas e flutuações séricas pequenas geralmente não refletem deficiência nutricional e devem ser avaliados criteriosamente (BATES, 1983; HOWELLS et al., 1986; PANTH et al., 1990).

Segundo GAL & PARKINSON, (1974) o padrão fisiológico de flutuação sérica de vitamina A na gestação e no puerpério apresenta as seguintes características: queda das taxas no primeiro trimestre, seguida de tendência de aumento com o decorrer da gestação; novo declínio próximo ao término da gravidez; ligeiro incremento pós-parto e retorno às taxas não gravídicas, aproximadamente seis semanas após o parto. HOWELLS et al. (1986) observaram que as taxas de retinol sérico, registradas em gestantes saudáveis no decorrer da gestação, apresentavam-se inferiores às de mulheres saudáveis não grávidas. No estudo de PATH et al. (1990) as gestantes, no primeiro trimestre de gravidez, apresentaram valores plasmáticos de vitamina A significativamente inferiores aos das mulheres não grávidas. Os níveis aumentaram no decorrer da gravidez, atingindo um pico entre a 24^a e

26^a semana e apresentaram declínio significativo entre 34^a e 36^a semana. Esta diminuição dos valores séricos no terceiro trimestre de gestação pode decorrer da inadequação do estado nutricional das mulheres estudadas, pois não foi observada em gestantes de boa condição sócio-econômica americanas (GAL & PARKISON, 1974) ou indianas (SHAH *et al.*, 1987), embora tenha sido registrada entre gestantes indianas de baixa renda (SHAH *et al.*, 1987). A dependência das alterações plasmáticas de vitamina A da idade gestacional, decorre da ação de vários hormônios e de sinais metabólicos que interferem na mobilização da vitamina A para o suprimento da crescente demanda durante a gestação. O aumento plasmático no meio da gestação é fruto destes mecanismos. Entretanto, o estoque de algumas mulheres não é suficiente para suprir a demanda, o que determina a tendência de declínio das taxas de vitamina A no final da gestação (PATH *et al.*, 1990).

Em estudos utilizando CLAE para dosagem do retinol sérico de puérperas bem nutridas na Suíça (JANSSON *et al.*, 1983) e na Finlândia (MAYA-ALA-HOUHALA *et al.*, 1988) foram registrados teores médios de 37 e $29,6 \pm 8,4$ $\mu\text{g/dL}$ respectivamente. No segundo estudo observou-se diferença significativa entre o teor médio de retinol sérico descrito para as puérperas saudáveis ($29,6 \pm 8,4$ $\mu\text{g/dL}$) e o registrado como padrão normal de mulheres finlandesas não grávidas ($59,2 \pm 12,9$ $\mu\text{g retinol/dL}$), provavelmente em decorrência de adaptações fisiológicas das taxas séricas de vitamina A, mesmo em mulheres bem nutridas. Em estudos utilizando técnicas colorimétricas para dosagem de vitamina A, foram observados teores séricos médios de 20 $\mu\text{g/dL}$ para puérperas indianas desnutridas (SHIRALI *et al.*, 1989) e de $21,8 \pm 0,6$ $\mu\text{g/dL}$ para puérperas de baixa renda (SHAL *et al.*, 1987).

Nesse estudo foi observado, passados 15 a 20 dias do parto, incremento das taxas séricas de retinol da sub-amostra de quatro nutrízes (Tabela 5). O valor médio observado (37 ± 9 $\mu\text{g/dL}$) enquadra-se nos critérios de normalidade do IVACG (ARROYAVE *et al.*,

1982). Esta alteração, sem que tenham ocorrido interferências dietéticas ou medicamentosas, parece corresponder a adaptações fisiológicas do grupo. Neste caso, a aparente recuperação dos teores registrados no puerpério confirmam a ausência de carência de vitamina A. Outro fator que reforça este raciocínio é a ausência absoluta de diagnóstico de HA através do método de ICCO. Este método apresenta como uma de suas vantagens a possibilidade de detecção da carência antes de manifestações clínicas e bioquímicas de HA (AMEDEE-MANESME et al., 1988).

Tem sido discutida a influência da paridade materna sob as taxas séricas de vitamina A. SHAH et al. (1984) não observaram associação entre os teores de vitamina A maternos ou de sangue de cordão com a paridade. YASSAI & MALEK (1989) observaram correlação inversa entre a paridade e os teores de vitamina A de sangue de cordão, apenas para mulheres com idade superior a 35 anos e com média de 5,8 + 1,9 partos. Neste estudo, em função da pequena amostragem, não foi possível avaliar esta variável.

Os dados dietéticos foram obtidos através de questionário seletivo de frequência no qual foram averiguados o consumo e o porcionamento de alimentos-fonte de vitamina A. A seletividade do questionário se justifica, visto que a vitamina A não é um nutriente amplamente presente nos alimentos em geral e cuja ingestão é bastante influenciada pela escolha dos alimentos durante o dia. A variação do consumo de vitamina A entre indivíduos e em diferentes dias (mesmos indivíduos) é expressiva na maioria das dietas (BEATON et al., 1983; RUSSEL-BRIEFEL et al., 1985) e reforça a importância do cuidado na coleta de dados. O questionário de frequência alimentar é um instrumento prático que tem sido utilizado, com bons resultados, na estimativa do consumo de vitamina A e carotenóides (WILLET et al., 1983; ROIDT et al., 1988).

Utilizando-se esta metodologia, estimou-se o consumo médio do

grupo em 781 ± 247 ER/dia (tabela 3), no último mês de gestação. Considerando a recomendação dietética de 800 ER /dia para gestantes (NRC-RDA, 1989) e tendo em vista que as recomendações são estimadas, com margens de segurança, excedendo os requerimentos normais e assegurando o suprimento das necessidades dos indivíduos em geral, o consumo do grupo não caracteriza inadequação alimentar com relação a este nutriente.

Como as informações sobre o teor dos diferentes carotenóides não estão disponíveis nas tabelas usuais de composição de alimentos (BEECHER & KHACHIK, 1984; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989), foi possível apenas a estimativa do consumo total de vitamina A e a distinção com relação a origem (animal ou vegetal) dos alimentos fonte do nutriente. O perfil alimentar observado (Tabela 3), com predominância de alimentos de origem vegetal como fonte de vitamina A, reforça a já reconhecida importância dos precursores de vitamina A no suprimento das necessidades de indivíduos e populações, que se faz ainda mais evidente entre os economicamente desprivilegiados .

Os alimentos mais consumidos e que contribuíram de forma mais significativa para a ingestão de vitamina A pelas gestantes ,no último mês de gestação, foram: o leite (consumido por 80% das gestantes estudadas), o tomate (80%), os folhosos (70%, com predominância do consumo de alface (50%) associado ou não ao consumo de outros folhosos), A cenoura (70%), a manteiga ou a margarina (60%), o fígado bovino sendo consumido por 40% das gestantes assim como os ovos e a goiaba (fruta em período de safra).

Os teores de vitamina A do soro, da dieta e do colostro das mães estudadas são listados na tabela 4 e apresentam grande variabilidade interindividual, como pode ser observado através dos valores de desvio padrão de cada uma das médias. Os teores de vitamina A observados são significativamente menores que os encontrados no colostro e não apresentam correlação com a ingesta de vitamina A,

dentro das condições do grupo estudado. Tal resultado é coerente com a regulação homeostática do retinol circulante, que mantém as taxas séricas relativamente constantes dentro de ampla faixa de consumo (OLSON, 1987). O retinol sérico reflete a ingestão de vitamina A, nas suas diversas formas, apenas nos casos extremos.

Nas condições deste estudo, também não foi encontrada correlação entre o consumo de vitamina A e as taxas deste nutriente no colostro. Estudo canadense (CHAPPELL *et al.*, 1985) apresentou este mesmo resultado e os autores sugeriram que o elevado teor de retinol encontrado no colostro decorre do sequestro ativo do retinol sérico pela glândula mamária para compensar o limitado transporte placentário do nutriente. Na Índia (GARG *et al.*, 1988), em estudo com ingestões inferiores às recomendadas, foram observadas taxas normais de retinol no colostro, sem que houvesse diferença significativa entre a composição do colostro de nutrízes bem e mal nutridas. Não foi também encontrada diferença significativa entre a composição do colostro de mães paquistanesas desprivilegiadas e a relatada em literatura como adequada (LINDLAD & RAHIMTOOLA, 1974). Correlação mínima (0,14) entre ingestão materna e teores de retinol foi registrada em estudo americano (KIM *et al.*, 1990) utilizando leite maduro. Por outro lado, em estudo sueco (GEBRE-MEDHIN *et al.*, 1976), foi registrada diferença significativa entre ingestão e a composição em retinol do leite de mulheres suecas (privilegiadas economicamente) e etíopes (privilegiadas e carentes).

Foi também evidenciada a ausência de correlação entre as taxas de retinol no soro e no colostro. Considerando-se o complexo retinol-RBP como a principal via de transferência de retinol do sangue para o leite (VAHLQUIST & NIELSSON, 1979) e o rigoroso controle das taxas fisiológicas do retinol sérico, relativamente estáveis enquanto houver alguma reserva hepática, (OLSON, 1987), o resultado encontrado foi compatível com o relatado na literatura. Entretanto, apesar desta relativa constância dos níveis de retinol-RBP, a concentração de

ésteres de retinol ligados a lipoproteínas aumenta proporcionalmente com o consumo de vitamina A, sendo que a transferência destes complexos para o leite pode contribuir para o total de vitamina A do mesmo (VAHLQUIST & NIELSSON, 1979).

6-CONCLUSÕES

- Os principais carotenóides encontrados no colostro de 10 mães de RNPT atendidas no CAISM (Campinas, SP) foram licopeno, α -criptoxantina, β e α -caroteno, nesta ordem.

- O grupo estudado não apresentou exames positivos (carência de vitamina A) para o teste de impressão citológica da conjuntiva ocular (ICCO).

- O consumo médio de vitamina A estimado (781 ± 247 ER/dia) não caracteriza inadequação, considerando-se as recomendações da RDA-1989.

- Não foi caracterizada hipovitaminose A no grupo estudado de acordo com os critérios do IVACG.

- Nas condições deste estudo, não foi observada correlação entre os teores de retinol no soro e no colostro, assim como entre a ingesta estimada de vitamina A e os mesmos teores.

- A determinação de carotenóides em leite humano por CLAE, com a utilização de Sudan I como padrão interno, mostrou-se apropriada e conveniente.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 01- AMEDEE-MANESME, O.; LUZEAU, R.; WITTEPEN, J.R.; HANCK, A. & SOMMER, A. Impression cytology detects subclinical vitamin A deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 47: 875-8, 1988.
- 02- ANDERSON, G.H.; ACTKINSON S.A. & BRYAN, M.H. Energy and macronutrient of human milk during early lactation from mothers giving birth prematurely and at term. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 258-265, 1981.
- 03- ARROYAVE, G.; CHICHESTER, C.O.; FLORES, H.; GLOVER, J.; MEJIA, L.A.; OLSON, J.A.; SIMPSON, K.L. & UNDERWOOD, B.A. Biochemical methodology for the assesement of vitamin A. In: *International Vitamin A Consultitave Group (IVACG) guidelines for erradication of vitamin A and xerophthalmia*. Washington, The Nutrition Fundation, 1982. 88p.
- Q4- ARROYAVE, G. Y MAYA, C. Descenso de los niveles sericos de retinol y su proteina de enlace (RBP) durante las infecciones. *Arch. Latinom. Nutr.* 29 (2): 233-260, 1979.

- 05- ARROYAVE, G.; MOSCOSO, Y.M. Y LECHTIG, A. Vitamina A en sangre de embarazadas y sus recién nacidos de dos grupos socio económicos. Arch. Latinoam. Nutr. 25 (3): 283-290, 1975.
- 06- BATES, C.J. Vitamin A in pregnancy and lactation. Proc. Nutri. Soc. 42 :65-79, 1983.
- 07- BATES, C.J.; LIU, D.S.; FULLER, N.J. & LUCAS, A. Susceptibility of riboflavin and vitamin A in breast milk to photodegradation and its implications for the use of banked breast milk in infant feeding. Acta Paed. Scan. 74: 40-44, 1985.
- 08- BATHIA, J. & ZIEGLER, E.E. Retinol-binding protein and prealbumin in cord blood of term and preterm. Early Hum. Dev. 8: 129-133, 1989.
- 09- BATISTA FILHO, M. Hipovitaminose A no Brasil elementos para fundamentação de uma proposta de intervenção: relatório 1988-1989 INAN. Brasília, INAN, 1989.
- 10- BATISTA FILHO, M.; TEIXEIRA, S.F.G. & LINHARES, E.D.R. Retinol sérico de gestantes atendidas em serviços de Saúde Pública. Rev. Bras. Pesq. Med. e Biol. 6: 215-221, 1973.
- 11- BAUERNFIELD, J.C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in food and feeds. J. Agr. Food Chem. 20 (3): 456-473, 1972.
- 12- BEATON, G.H.; MILNER, J.; Mc GUIRE, V.; FEATHER, T.E. & LITTLE, J.A. Source of variance in 24-hour dietary recall data: implications for nutrition study design

- and interpretation. Carbohydrate sources, vitamins and minerals. *Am. J. Clin. Nutr.* 37: 986-995, 1983.
- 13- BEECHER, G.R. & KHACHIK, F. Evaluation of vitamin A and carotenoid data in food composition table. *JNCI* 73 (6): 1397-1404, 1984.
 - 14- BENDICH, A. Carotenoids and the immune response. *J. Nutr.* 119: 112-115, 1989.
 - 15- BENDICH, A. & LANGSETH, L. Safety of vitamin A. *Am. J. Clin. Nutr.* 49:358-371, 1989.
 - 16- BENDICH, A. & OLSON, J.A. Biologycal actions of carotenoids. *FASEB* 3:1927-1932, 1989.
 - 17- BIERI, J.G.; TOLLIVER, T.J. & CATGNANI, G.L.
Simultaneous determination of alfa-tocoferol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 2143-2149, 1979.
 - 18- BITMAN, I.; WOOD, D.L.; HAMOSH, M.; HAMOSH, P. & METHA, N.R. Comparison of the lipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 38: 300-312, 1983.
 - 19- BLOEM, M.W.; WEDEL, M.; EGGES, R.J.; SPEEK, A.T.; SCHRYVER, J.; SAOWAKONTA, S. & SCHREWS, W.H.P. Mild vitamin A and risk of respiratory tract diseases and diarrhea in preeschool and school children in northeast Thailand. *Am. J. Epidemiol.* 131 (2): 332-339, 1990.

- 20- BOLLAG, W. & HARTMAN, H.R. Prevention and therapy of cancer with retinoids in animals and man. *Cancer Surv.* 2: 293-314, 1983.
- 21- BRANDT, R.B.; MUELLER, D.G.; SCHROEDER, J.R.; GUYER, K.E.; KIKPATRIC, B.V.; HUTCHER, N.E. & EHRLICH, F.E. Serum vitamin A in premature and term neonates. *J. Ped.* 92 (1): 101-104, 1978.
- 22- BROWN, K.H.; BLACK, R.E.; ROBERTSON, A.D.; AKHTAR, N.A; AHMED, G. & BECKER, S. Clinical and field studies of human lactation: methodological considerations. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 745-756, 1982.
- 23- BURTON, G.W. Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr.* 119: 109-111, 1989.
- 24- BUTTE, N.F. & CALLOWAY, D.H. Evaluation of lactation performance of Navajo women. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 2211-2215, 1981.
- 25- CANFIELD, M.; FORAGE, J.W. & VALENZUELA, J.G. Carotenoids as cellular antioxidants. *P.S.E.B.M.* 200: 260-265, 1992.
- 26- CAPURRO, H.; KONICHESKY, S.; FONSECA, D. & CALDEYRO-GARCIA, R. A simplified method for diagnoses of gestational age in newborn infant. *J. Pediatr.* 93: 120-124, 1978.
- 27- CHANDRA, R.J. & VYAS, D. Vitamin A, immunocompetence and infection. *Food Nutr. Bull.* 11 (3): 12-19, 1989.
- 28- CRAFT, N.E.; BROWN, E.D. & SMITH JR, J.C. Effects

of storage and handling conditions on concentration of individual carotenoid, retinol and tocopherol in plasma. Clin. Chem. 34: 44-48, 1988.

- 29- CHAPPELL, J.E.; FRANCIS, T. & CLANDININ, M.T. Vitamin A and E of human milk at early stages of lactation. Early Human Dev. 11: 157-167, 1985.
- 30- COMADINI, H.B.; RAMOS, J.L.A. & NESTARY, J.E. Prematuridade. In: MARCONDES E. *Pediatria básica*. 5. ed. São Paulo, Savier, 1979. p. 1520-1529.
- 31- DE LUCA, L.M.; ADAMO, S. BHAT, P.V.; SASAK, W.; SILVREMAN-JONES, C.S.; AKALOUSKI, I.; FRT-COUTAZ, J.P.; FLETCHER, T.R. & CHANDER, J.G. Recent developments in studies on biological functions of vitamin A in normal and ransformed tissues. Pure and Appl. Chem. 51: 581-591, 1979.
- 32- DE LUCA, L.M.; GLOVER, J.; HELLER, J.; OLSON, J.A & UNDERWOOD, B. Recents advances in the metabolism and function of vitamin A and their relationship to applied nutrition. In: Internatinal Vitamin A Consultative Group Guidelines for erradication of vitamin A deficiiecy and xerophthalmia. Washington, The Nutrition Fundation, 1977. 44p.
- 33- DE LUCA, L.M. & DOWELL, E.M.. Effects of vitamin A status on tracheal epithelium in vivo and in vitro. Food Nutr. Bull. 11 (3): 20-24, 1989.
- 34- DI MASCIO, P.; KAISER, S. & SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. Arch Biochem Biophys. 274: 532-538, 1989.

- 35- DIMITROV, N.V.; MEYER, C.; ULLREY, D.E.; CHENOWETH, W.; MICHELAKIS, A.; MALONE, W.; BOONE, C. & FINK, G. Bioavailability of β carotene in human. *Am. J. Clin. Nutr.* 48: 298-304, 1988.
- 36- FAO/WHO Requirement of vitamina A, iron, folate and vitamin B 12. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation. Rome, Food and Agriculture Organization, 1988. (FAO Food and Nutrition Series N^o 23).
- 37- FEACHEM, R.G. Vitamin A deficiency and diarrhoea: a review of interrelationship and their implications for the control of xerophthalmia and diarrhoea. *Trop. Dis. Bull.* 84 (3): R2-R14, 1987.
- 38- FLORES, H.; CAMPOS, F.; ARAUJO, C.R.C. & UNDERWOOD, B.A. Assessment of marginal vitamin A deficiency in brazilian children using the relative dose response procedure. *Am. J. Clin. Nutr.* 40 (6): 1281-1289, 1984.
- 39- FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (FIBGE). Consumo alimentar. Antropometria. Rio de Janeiro, 1977/1978 (Estudo Nacional de Despesa Familiar -ENDEF- v. 4)
- 40- FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (FIBGE). Tabelas de Composição de Alimentos. 3. ed. Rio de Janeiro, 1985. (Estudo Nacional de Despesa Familiar -ENDEF- v. 3)
- 41- GAL, I. & PARKINSON, C.E. Effects of nutrition and others factors on pregnant women's serum vitamin A

- levels. Am J Clin Nutr. 27: 688-695, 1974.
- 42- GANGULY, C. & MUHERJEE, K.L. Relationship between maternal serum vitamin A and vitamin A status of the corresponding fetuses. J. Trop. Ped. 34: 313-315, 1988.
- 43- GARG, M.; THIRUPURAM, S. & SAHA, K. Colostrum composition, maternal diet and nutrition in north India. India. J. Trop. Pediatr. 34: 79-85, 1988.
- 44- GEBRE-MEDHIN, M.; VAHLQUIST, A.; HOFVANDER, Y.; UPPSALU, L. & VAHLQUIST, S. Breast milk composition in Ethiopian and Swedish mothers. 1. Vitamin A and beta-carotene. Am. J. Clin. Nutr. 29: 441-451, 1976.
- 45- GEBRE-MEDHIN, M. & VAHLQUIST, A. Vitamin A nutrition in human foetus. Acta Paed. Scand. 73: 333-340, 1984.
- 46- GERSTER, H. Potential role of β -carotene in the prevention of cardiovascular disease. Inter. J. Vit. Res. 61: 227-291, 1991.
- 47- GROSS, S.J.; GELLER, J. & TOMARELLI, R.M. Composition of breast milk of mothers of preterm infants. Pediatrics 68 (4): 490-493, 1981.
- 48- GURR, M.I. Review of the progress of dairy science: Human and artificial milks in infant feeding. J. Dairy Res. 48: 519-554, 1981.
- 49- GUTCHER, G.R.; LAX, A.A. & FARRELL, P.M. Vitamin A losses to plastic intravenous infusion devise and

- a improved method of delivery. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 8-13, 1984.
- 50- HALL, B. Uniformity of human milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 304-312, 1979.
- 51- HENNEKENS, C.H. & EBERLEIN, K. A randomized trial of aspirin and β -carotene among US physicians. *Prev. Med.* 14:165-168, 1985.
- 52- HEYWOOD, R.; PALMER, A.K.; GREGSON, R.C. & HUMMLER, H. The toxicity of β -carotene. *Toxicol.* 36: 91-98, 1985.
- 53- HOWELLS, D.W.; HASTR, F.; ROSENBREG, D.; BROWN, I.R.F. & BROOKE, O.G. Investigation of vitamin A nutrition in pregnant british asians and their infants. *Human Nutr.: Clin Nutr.* 40 C: 43-50, 1986.
- 54- HYTTEN, F.E. Clinical and chemical studies in human lactation. *Brit. Med. J.* 23: 175-182, 1954.
- 55- HUSSEIN, L.; EL-SHAWARBY, O.; EL NAGGAR, B. & ABDELMEGID, A. Serum vitamin A and carotene concentration among egyptian fullterm neonates in relation to maternal status. *Inter. J. Nutr. Res.* 58: 139-145, 1989.
- 56- HUSTEAD, V.A; GUTCHER, G.R; ANDERSON, S.A. & ZACHMAN, R.D. Relationship of vitamin A (retinol) status to lung disease in the preterm infant. *J. Ped.* 105 (4): 611-615, 1984.

- 57- ISMADI, S.D. & OLSON, J.A. Vitamin A transport in human fetal blood. *Am. J. Clin. Nutr.* 8: 967-972, 1975.
- 58- JACKSON, D.A.; IMONG, S.M.; SILPRASERT, A.; RUCKPHAOPUNT, S.; WOOLRIDGE, M.W.; BAUM, J.D. & AMATAYAKUL, K. Circadian variation in fat concentration of breast milk in a rural northern Thai population. *British J. Nutr.* 59: 349-363, 1988.
- 59- JACQUES ET JACQUES, P.F. & CHYLACK JR, L.T. Epidemiological evidence of role for the oxidant vitamins and carotenoids in catarat prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 352S- 355S, 1991.
- 60- JANSON, L. & NIELSSON, B. Serum retinol and retinol binding protein in mothers and infants at delivery. *Biol. Neonate* 43: 269-271, 1983.
- 61- KELNER, M. Vitamina A e caroteno no ciclo grávido-puerperal. Estudo de alguns aspectos em pacientes pobres do Recife. *Rev. Bras. Med.* 26:520-531, 1969.
- 62- KNEKT, P.; AROMAA, A.; MAATIBA, J.; AARAN, R.; NIKKARI, T.; HAKAMA, M.; HAKULINEN, T. ; PETO, R. & TEPPON, L. Serum vitamin A and subsequent risk of cancer: cancer incidence follow up of the Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey. *Am. J. Epidemiol.* 135 (5): 857-870, 1990.
- 63- KIM, Y.; ENGLISH, C.; REICH, P.; GERBER, L.E. & SIMPSON, K.L. Vitamin A and carotenoids in human milk. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1930-1933, 1990.

- 64- LAURINDO, V.M.; CALIL, T.; LEONE, C.R.; RAMOS, J.L.A.
Composição nutricional do colostro de mães de recém nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II Composição nutricional do leite nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca. *Pediatria* 14 (1): 9-13, 1992
- 65- LEMONS, J.A.; MOYE, L.; HALL, D. & SIMMONS, M.
Influence in the composition of preterm and term milk during early lactation. *Ped. Res.* 16: 113-117, 1982.
- 66- LEUNG, A.K.C.; SIU, T.O.; CHIU, A.S.K.; ROBSON, W.L.M. & LARSEN, T.E. Serum carotene concentrations in normal infants and children. *Clin. Ped.* 29 (10): 575-578, 1990.
- 67- LINDBLAD, B.S. & RAHIMTOOLA, R.J. A pilot study of the quality of human milk in a lower socio-economic group in Karachi, Pakistan. *Acta Paed. Scand.* 63: 125-128, 1974.
- 68- LOTAN R. Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochem Biophys. Acta* 605: 33-91, 1980.
- 69- LUZEAU, R.; CARLIER, C. & AMEED- MANESME, O.
Impression cytology with transfer: an easy method for detection of vitamin A deficiency. *Inter. J. Nutr.* 58 (2): 166-170, 1988.
- 70- LYENGAR L. & APTE, S.V. Nutrient stores in human foetal livers. *Brit. J. Nutr.* 27: 313-317, 1972.

- 71- MARGETTS, B.M.; CADE, J.E. & OSMOND, C. Comparison of food frequency questionnaire with a diet record. *Int. J. Epidemiol.* 18 (4): 868-873, 1989.
- 72- MARTINS FILHO, J. Como e porque amamentar. São Paulo, Savier, 1984. 220 p.
- 73- MILTON, R.C.; REDDY, V. & NAIDU, A. Mild vitamin A deficiency and childhood morbidity - an Indian experience. *Am. J. Clin. Nutr.* 46: 827-829, 1987.
- 74- NATADISASTRA, G.; WITTPENN, J.R.; MUHILAL; WEST JR, K. P.; MELE, L. & SOMMER, A. Impression cytology: a practical index of vitamin A status. *Am. J. Clin. Nutr.* 48: 695-701, 1988.
- 75- National Research Council NRC. Recommended dietary allowances RDA. 10. ed. Washington, National Academy Press, 1989.
- 76- NEU, J.; VALENTINE, C & MEETZE, W. Scientifically-based strategies for nutrition of high-risk birth weight infant. *Eur. J. Pediatr.* 150: 2-13, 1990.
- 77- NEVILLE, M.C.; KELLER, R.P.; SEACAT, J.; CASEY, C.E.; ALLEN, J.C. & ARCHER, P. Studies on human lactation. I Within-feed and between-breast variation in selected components of human milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 635-646, 1984.
- 78- OLSON, J.A. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in human. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 704-716, 1987.

- 79- OLSON, J.A. Vitamin A, retinoids and carotenoids. In: SHILS, M.E. & YOUNG, V.R. eds. *Modern nutrition in health and disease*. 7. ed. Philadelphia, Lea & Febinger, 1988. p 292-312.
- 80- OLSON, J.A. Carotenoids, vitamin A and cancer. *J. Nutr.* 116: 1127-1130, 1986.
- 81- OLSON, J.A.; GUNNING, D.B. & TILTON, R.A. Liver concentration of vitamin A and carotenoids as a function of age and other parameters of American children who died of various causes. *Am. J. Clin Nutr.* 39: 903-910, 1984
- 82- ORZALESI, M. & COLARIZI P. Critical vitamin for low birthweight infants. *Acta Paed. Scand. Suppl.* 296: 104-109, 1982.
- 83- OSTREA, E.M.; BALUN, J.E.; WINKLER, R. & PORTER, T. Influence of breast-feeding on the restoration of low serum concentration of vitamin E and β -carotene in the newborn infant. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 154 (5): 1014-1017, 1986.
- 84- PANTH, B.M.; SHATRUGNA, Y. YASODHARA, P. & SIVAKUMAR, B. Effect of vitamin A supplementation on haemoglobin and vitamin A levels during pregnancy. *Brit. J. Nutr.* 64: 351-358, 1990.
- 85- PARKER, R.S. Carotenoid in human blood and tissues. *J. Nutr.* 119: 101-104, 1989.
- 86- PARRISH, D.B.; MOFFITT, R.A.; NOEL, R.J. & TOMPSON, J.N. Vitamin A. In: AUGUSTIN, J.; KLEIN, B.P.; BECKER, D.

- & VINUGOPAL, P.B.. **Methods of vitamin assay**. 4. ed. New York, Jonh Wiley & Sons, 1985. p. 153-184.
- 87- PASSOS, P.A.L. & BARROS FILHO, A.A. A importância da vitamina A na saúde da criança. **Medicina** 25 (3): 241-250, 1992.
- 88- PATTON, S.; CANFIELD, L.M., HUSTON, G.H., FERRIS, A.M. & JENSEN, R.G. Carotenoids of human milk. **Lipids** 25: 159-165, 1990.
- 89- QUACHENBUSH F. W. & SMALLIDGE, R.L. Nonaqueous reserve phase liquid chromatographic system for separation and quantification of provitamin A. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 69 (5): 767-772, 1986.
- 90- RAMOS, D.M.R. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Determination of the vitamin A of commom brazilian leafy vegetables. **J. Micronutr. Anal.** 3: 147-155, 1987.
- 91- REDDY, V.; RAO, V.; ARUNJYOTHI & REDDY, M. Conjunctival impression cytology for assessment of vitamin A status. **Am. J. Clin. Nutr.** 50: 814-817, 1989.
- 92- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Critical review of provitamin A determination in plant food. **J. Micronutrient Anal.** 5: 191-225, 1989.
- 93- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KUMURA, M.; GODOY, H.T. & ARIMA, H.K. Assessment of provitamin A determination by open column chromatography/visible absortion spectrophotometry. **J. Chromatogr. Sci.** 26: 624-629, 1988.

- 94- ROIDT, L.; WHITE, E.; GOODMAN, G.E.; WAHL, P.W.; OMENN, G.S.; ROLLINS, B. & KARKECK, J.M.. Association of food frequency questionnaire estimates of vitamin A intake with serum vitamin A level. *Am. J. Epidemiol.* 128 (3): 645-654, 1988.
- 95- ROJANAPO, W.; LAMB, A.J. & OLSON, J.A. The prevalency, metabolism and migration of goblet cells in rat intestine following the induction of rapid synchronous vitamin A deficiency. *J. Nutr.* 110: 178-188, 1980.
- 96- RONCADA, M.J. & MAZZILLI, R.N. Fontes de vitaminas na dieta de populações do estado de São Paulo, Brasil. *Alim. Nutr.* 1:71-86, 1989.
- 97- RONCADA, M.J. & SZARFARC, S.C. Hipovitaminose A e anemia ferropriva em gestantes de duas comunidades do Vale do Ribeira (Estado de São Paulo, Brasil). *Rev. Saúde Públ.* 9: 99-106, 1975.
- 98- ROSS, A.C. Vitamin A relationship to immunity and the antibody response. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 200: 303-320, 1992.
- 99- RUSSELL-BRIEFEL, R.; CAGGUILA, A.W. & KRILLER, L.H. A comparison of three dietary methods for estimating vitamin A intake. *Am. J. Epidemiol.* 122 (4): 628-636, 1985.
- 100- SAINI, A.S.; LAL, H.; AGARWAL, S.K. & KAUR, T. Human milk and infant nutrition. *Ind. Ped.* 27 (7): 681-702, 1990.

- 101- SANN, L.; BIENVENU, F.; LAHET, C.; BIENVENU, J. & BETHENOD, M. Comparison of the composition of breast milk of mothers of term and preterm infants. *Acta Paediatr. Scan.* 70: 115-116, 1981.
- 102- SANTOS, L.M.P. Prevalência da deficiência de vitamina A no Brasil: ênfase para a região nordeste. Relatório à FAO. Salvador, 1988.
- 103- SASANOW, S.R.; SPITZER, A.R.; PERREIRA, G.R.; HEALF, L. & WATKINS, J.B. Effect of gestational age upon prealbumin and retinol binding protein in preterm and term infants. *J. Pediatr. Gastroent. Nutr.* 5: 111-115, 1986.
- 104- SAUBERLICH, H.E.; HODGES, R.E.; WALLACE, D.L.; KOLDER, H.; CANHAM, J.E.; HHOD, J.; RAICA JR, N. & LOWRY, L.K. Vitamin A metabolism and requeriments in the human studied with the use of labeled retinol. *Vitamin Horm.* 32: 251-275, 1974.
- 105- SCOTT, K.J. Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC. *Food Chem.* 45: 357-364, 1992
- 106- SHAH, R.S. & RAJALAKSHMI, R. Liver stores of vitamin A in human fetuses in relation to gestational age, fetal size and maternal nutritional status. *Brit. J. Nutr.* 58: 181-189, 1987.
- 107- SHENAI, J.P.; CHYTIL, F.; JHAVERI, A. & STAHLMAN, M.T. Plasma vitamin A and retinol binding protein in premature and term neonates. *J. Pediatr* 99: 302-305, 1981.

- 108- SHENAI, J.P.; KENNEDY, K.A.; CHYTIL, F. & STAHLMAN, M.T. Clinical trial of vitamin A supplementation in infants susceptible to bronchopulmonary dysplasia. *J. Ped.* 111: 269-277, 1987.
- 109- SHIRALI, G.S.; OELBERG, D.G. & MEHTA, K.P. Maternal neonatal serum vitamin A concentration. *J. Ped. Gastr. Nutr.* 9: 62-66, 1987.
- 110- SIMPSON, K.L. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proc. Nutr. Soc.* 42: 7-17, 1983.
- 111- SKLAN, D. Vitamin A in human nutrition. *Prog. Food Nutr. Sci.* 11: 39-55, 1987.
- 112- SNEDEW, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 6. ed. Iowa, The Yowa State University Press, 1967.
- 113- SOMMER, A.; KATZ, J. & TARWOTJO, I. Increased risk of respiratory disease and diarrhea in child with preexisting mild vitamin A deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 1090-1095, 1984.
- 114- SOMMER, A.; HUSSAINI, G.; TARWOTJO, I. & SUSANTO, D. Increased mortality in children with mild vitamin A deficiency. *Lancet* 585-588, 1983.
- 115- SPORN, M.B. & ROBERTS A.B. Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *JNCI* 73 (6): 1381-1386, 1984.
- 116- TARWOTJO, I.; SOMMER, A.; WEST Jr, K.P.; DJUNAEDI, E.; MELE, L.; HAWKINS, B. & Aceh Study Group. Influence

- of participation on mortality in a randomized trial of vitamin A prophylaxis. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 1466-1471, 1987.
- 117- TEE, E-SEONG. Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 31 (1/2): 103-163, 1992.
- 118- UNDERWOOD, B.A. Methods for assessment of vitamin A status. *J. Nutr.* 120: 1459-1463, 1990.
- 119- VAHLQUIST, A. & NIELSSON, S. Mechanisms for vitamin A transfer from blood to milk in rhesus monkeys. *J. Nutr.* 109: 1456-1463, 1979.
- 120- VAHLQUIST, A. & NIELSSON, S. Vitamin A transfer to the fetus and to the amniotic fluid in rhesus monkey (*Macaca Mulatta*). *Ann. Nutr. Metab.* 28: 321-333, 1984.
- 121- WEST JR, K.P.; HOWARD G.R. & SOMMER, A. Vitamin A and infection: public health implications. *Ann. Rev. Nutr.* 9: 63-69, 1989.
- 122- WILLETT, W.C.; STAMPFER, M.J.; UNDERWOOD, B.A.; SPEIZER, F.E.; ROSNER, B. & HENNEKENS, C.H. Validation of a dietary questionnaire with plasma carotenoid and α -tocopherol levels. *Am. J. Clin. Nutr.* 38: 631-639, 1983.
- 123- WITTPENN, J.R.; TSENG, S. & SOMMER, A. Detection of early xerophthalmia by impression cytology. *Arch. Ophthalmol.* 104: 237-239, 1986.

- 124- WITTPENN, M.D.; WEST JR, K.P.; KEENUM, D.; FARAZDAGHI, M.A.M.; HUMPHREY, J.; HOWARD, G.R. & SOMMER, A. Training manual assessment of vitamin A status by impression cytology. Baltimore, Internatinal Center for Epidemiologic and Preventive Ophthalmology (ICEPO), 1988. 25 p.
- 125- WOODRUFF, C.N.; LATHAM, C.B.; JAMES, E.P.; HEWETT, J.E. Vitamin A status of preterm infants the influence of feeding and vitamin supplements. Am. J. Clin. Nutr. 44 (3): 384-389, 1986.
- 126- WORTHINGTON-ROBERTS, B. Lactação e leite humano: considerações nutricionais. In: WORTHINGTON-ROBERTS, B., VERMEERSCH, J. & WILLIAMS, S.R. eds. Nutrição na gravidez e lactação. 3. ed. Rio de Janeiro, Ed. Interamericana, 1986. p 165-183.
- 127- YASSAI, M.B. & MALEK, F. Newborn vitamin A in relation to sex and birth weight. J. Trop. Pediatr. 35: 247-249, 1989.
- 128- ZACHMAN, R.D. Retinol (vitamin A) and the neonate: special problems of the human premature. Am. J. Clin. Nutr. 50: 413-424, 1989.
- 129- ZIEGLER, R.G. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. J. Nutr. 119: 116-122, 1989.
- 130- ZIEGLER, R.G. Vegetables, fruits and carotenoids and risk of cancer. Am. J. Clin. Nutr. 53 (1): 251S-259S, 1991.

- 131- ZILE, M.H.; BUNG, E.C. & DE LUCA, H.F. On the physiological basis of vitamin A stimulated growth. J. Nutr. 109: 1787-1796, 1979.

FICHA 1

1- IDENTIFICAÇÃO:

DATA:

IDADE: _ _ . anos

COR: _ _

CONSUMO:	VITAMINA A	DOSE/DIA: _ _	PERÍODO:
	ALCOOL	DOSE/DIA: _ _	PERÍODO:
	FUMO	CIGARRO/DIA _ _	PERÍODO:

N^o PESSOAS VIVENDO DA RENDA FAMILIAR: _ _

PUÉRPERA:	RENDA:	_ _ S.M.
	ESCOLARIDADE:	_ _

COMPANHEIRO:	RENDA:	_ _ S.M.
	ESCOLARIDADE:	_ _

OUTROS:	RENDA:	_ _ S.M.
	RENDA:	_ _ S.M.
	RENDA:	_ _ S.M.

RENDA FAMILIAR:	_ _ S.M.
-----------------	----------

2-DADOS OBSTÉTRICOS E DO RNPT:

N^o GESTAÇÕES: _ _ N^o ALEITAMENTOS: _ _

IDADE GESTACIONAL: _ _ semanas _ _ dias

AIG-PIG-GIG

DATA DE NASCIMENTO: _ _ / _ _ / _ _

SEXO: _

PESO: _ _ _ _ g

ESTATURA: _ _ , _ cm

INTERCORRÊNIAS:

DROGAS DURANTE A GRAVIDEZ:

Alimento	Frequência			Quantidade	Forma de Preparo
	Diária	Semanal	Mensal		
CAQUI					
GOIABA					
LARANJA					
MAMÃO					
MANGA					
MARACUJÁ					
LEITE					
QUEIJOS					
REQUEIJÃO					
MANTEIGA					
MARGARINA					
CREME DE LEITE					
FRANGO					
PEIXE					
CARNE DE BOI					
FÍGADO					
OVOS					
MAIONESE					