

VITAMINA E NO LEITE HUMANO E SUA RELAÇÃO COM O REQUERIMENTO NUTRICIONAL DO RECÉM-NASCIDO A TERMO

Vitamin E in human milk and its relation to the nutritional requirement of the term newborn

Anna Larissa Cortês da Silva^a, Karla Danielly da Silva Ribeiro^{a,*}, Larisse Rayanne Miranda de Melo^a, Dalila Fernandes Bezerra^a, Jaluza Luana Carvalho de Queiroz^a, Mayara Santa Rosa Lima^a, Jeane Franco Pires^a, Danielle Soares Bezerra^b, Mônica Maria Osório^c, Roberto Dimenstein^a

RESUMO

Objetivos: Determinar a concentração de alfa-tocoferol no leite materno em diferentes períodos de lactação e estimar o provável fornecimento de vitamina E ao lactente.

Métodos: Estudo longitudinal observacional realizado com 100 puérperas atendidas para o parto no Hospital Universitário Ana Bezerra (HUAB) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em Santa Cruz (RN). Foram coletados leite colostro (n=100), leite de transição (n=77) e leite maduro (n=63) no seguimento da lactação. O alfa-tocoferol foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência. O fornecimento de vitamina E para o neonato foi estimado comparando-se o requerimento nutricional de vitamina E (4 mg/dia) com a ingestão diária de leite.

Resultados: A concentração média de alfa-tocoferol encontrada nos leites colostro, de transição e maduro foi 40,5±15,0 µmol/L, 13,9±5,2 µmol/L e 8,0±3,8 µmol/L, respectivamente (p<0,001). A possível ingestão desses leites pelo lactente forneceu 6,2 mg/dia de vitamina E no colostro, 4,7 mg/dia no de transição e 2,7 mg/dia no maduro (p<0,0001), evidenciando que apenas o último não garantiu a quantidade recomendada dessa vitamina.

Conclusões: Os níveis de alfa-tocoferol no leite diminuíram com a progressão da lactação, e a provável ingestão dos leites colostro e de transição conseguiu atender ao requerimento nutricional do lactente. O leite maduro pode fornecer menores quantidades da vitamina E, o que torna importante o estudo dos fatores que se associam a esses baixos níveis.

Palavras-chave: alfa-tocoferol; leite humano; lactação; recomendações nutricionais; lactente.

ABSTRACT

Objectives: To determine the alpha-tocopherol concentration in breast milk at different periods of lactation and to estimate the possible supply of vitamin E to the infant.

Methods: A longitudinal observational study was carried out with 100 mothers at University Hospital Ana Bezerra (HUAB), at Universidade Federal do Rio Grande do Norte, in Santa Cruz (RN), Northeast Brazil. Samples of colostrum (n=100), transitional milk (n=77), and mature milk (n=63) were collected. Alpha-tocopherol was analyzed by high-performance liquid chromatography. Vitamin supply to the newborn was estimated by comparing the nutritional requirement of vitamin E (4 mg/day) with the potential daily intake of milk.

Results: The mean alpha-tocopherol concentration found in colostrum, transitional, and mature milk was 40.5±15.0 µmol/L, 13.9±5.2 µmol/L, and 8.0±3.8 µmol/L, respectively (p<0.001). The possible effect of these milks offered to the infant 6.2 mg/day of vitamin E in colostrum, 4.7 mg/day in transitional milk, and 2.7 mg/day in mature milk (p<0.0001), shows that only the mature milk did not guarantee the recommended quantity of this vitamin.

Conclusions: Alpha-tocopherol levels in human milk decrease through the progression of lactation, and the possible intake of colostrum and transitional milk met the nutritional requirement of the infant. Mature milk may provide smaller amounts of vitamin E. Thus, it is important to study the factors that are associated with such low levels.

Keywords: Alpha-tocopherol; breast milk; lactation; recommended dietary allowances; infant.

*Autor correspondente. E-mail: karladaniellysr@yahoo.com.br (K.D.S. Ribeiro).

^aUniversidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brasil.

^bUFRN, Santa Cruz, RN, Brasil.

^cUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

Recebido em 8 de julho de 2016; aprovado em 11 de outubro de 2016; disponível on-line em 08 de junho de 2017.

INTRODUÇÃO

A vitamina E, nomenclatura usada para descrever os compostos com atividade biológica de alfa-tocoferol, é um micronutriente lipossolúvel de extrema importância aos estágios iniciais da vida, pois atua na defesa contra a toxicidade do oxigênio no ambiente extrauterino e apresenta restrita transferência placentária para o feto durante o período gestacional. Sendo assim, o leite materno torna-se responsável por suprir a demanda dessa vitamina para o neonato nesse período inicial e durante a lactação,^{1,2} protegendo-o do desenvolvimento dos sinais e sintomas relacionados à sua deficiência, como a anemia hemolítica, a displasia broncopulmonar, as disfunções neurológicas e o aumento da mortalidade neonatal.³

O leite humano fornece aporte nutricional, imunológico e emocional à saúde do lactente, sendo preconizada a prática do aleitamento materno exclusivo até os seis meses de vida. Sua composição sofre alterações durante o período de lactação, de acordo com as necessidades do recém-nascido.⁴ Sabe-se que o conteúdo de vitamina E decresce conforme o tempo de lactação, sendo o colostro o tipo que apresenta o maior teor dessa vitamina.⁵

Alguns trabalhos determinaram os níveis de alfa-tocoferol no leite materno analisando apenas um ou dois momentos da lactação.^{6,7} Entretanto, quando se trata de estudos longitudinais, poucos consideram a análise da vitamina nos três estágios de lactação — colostro, de transição e maduro —,^{4,8,9} sendo rara a abordagem com a estimativa do fornecimento de vitamina E ao lactente.

A *Dietary Reference Intake* (DRI) preconiza a ingestão de 4 mg/dia de vitamina E (alfa-tocoferol) para crianças entre 0 e 6 meses de vida. Essa recomendação é baseada em um valor de ingestão adequada (*adequate intake* – AI) determinada por meio do cálculo da concentração média de vitamina E no leite humano produzido durante os seis primeiros meses de lactação e do consumo médio de 780 mL de leite ao dia.¹⁰

Diante da importância de um aporte nutricional adequado em vitamina E nos processos de prevenção e promoção de saúde do neonato e da escassez de estudos longitudinais com a abordagem no requerimento nutricional do lactente, este trabalho teve como objetivos avaliar a concentração de vitamina E (alfa-tocoferol) em três diferentes estágios de lactação — no colostro (até o terceiro dia pós-parto), no leite de transição (entre o 7.º e o 15.º dia) e no leite maduro (30 dias pós-parto) —, e estimar o provável fornecimento da vitamina oriunda da ingestão do leite de lactantes.

MÉTODO

Este estudo foi do tipo longitudinal observacional, composto de 100 parturientes recrutadas no Hospital Universitário Ana

Bezerra (HUAB) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em Santa Cruz (RN), Brasil, no período de 2012 a 2014. Foram incluídas mulheres maiores de 18 anos sem doenças crônicas diagnosticadas que tiveram parto termo (>37 semanas gestacionais) com conceito único e sem má-formação congênita ou síndromes. Foram excluídas aquelas que receberam suplementação de vitamina E durante a gestação e o puerpério, a fim de analisar as condições naturais de fornecimento vitamínico ao recém-nascido.

Após os esclarecimentos sobre a pesquisa, todas as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética da UFRN (CAAE 07416912.8.0000.5537). As características gerais foram obtidas do prontuário clínico de cada paciente.

Foram realizadas três coletas de leite procedentes da mesma mulher. Os procedimentos ocorreram no ambulatório do hospital ou em visita domiciliar previamente agendada com a participante. Todos os leites colostro foram coletados no hospital até três dias após o parto (n=100); os leites de transição, entre 7 e 15 dias após o parto (n=77); e os leites maduro, por volta de 30 a 40 dias após o parto (n=63). As perdas no seguimento da pesquisa foram em decorrência da interrupção do aleitamento materno, das mudanças de contato telefônico ou endereço sem aviso prévio — o que impossibilitava a marcação da visita domiciliar —, ou da desistência da participante.

As amostras foram obtidas por expressão manual de única mama, no início e no fim da mamada, após jejum noturno de 8 a 12 horas. Para o colostro foram realizadas duas coletas, sendo a segunda 24 horas após a primeira para corrigir possíveis variações na concentração do alfa-tocoferol nas primeiras secreções de leite.

As amostras foram coletadas em tubos de polipropileno protegidos da luz para evitar possíveis perdas vitamínicas, transportadas sob temperatura de refrigeração ao Laboratório de Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição (LABAN) e armazenadas a -20°C sob atmosfera de nitrogênio para posterior extração lipídica e análise do alfa-tocoferol.

A análise de alfa-tocoferol no leite deu-se segundo o método de Ortega et al.¹¹ adaptado. Em 1 mL de leite foi adicionada a mesma quantidade de etanol 95% (Merck, São Paulo, Brasil) para desnaturação e precipitação proteica, e 2 mL de hexano (Merck, São Paulo, Brasil) como solvente orgânico extrativo. As alíquotas foram agitadas por 1 minuto em vórtex e centrifugadas a 4.000 xg durante 10 minutos para, então, o sobrenadante obtido — fase hexânica — ser transferido a outro tubo. Essa etapa foi repetida mais uma vez, e a fase hexânica, evaporada em banho-maria a 37°C. Para a aplicação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o extrato seco foi dissolvido em 250 µL de diclorometano/metanol, na proporção de 2:1, e 20 µL foram injetados no aparelho.

As concentrações de alfa-tocoferol das amostras de soro foram determinadas por CLAE em cromatógrafo da marca Shimadzu (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão), com bomba LC 20AT Shimadzu, acoplado a um detector SPD-20AT Shimadzu UV-VIS e comunicador *bus module* CBM 20A Shimadzu com uma coluna LiChroCART®, com fase móvel metanol 100%, fluxo 1,0 mL/min e comprimento de onda de 292 nm. O *software* para análise foi o LC Real Time analysis.

A identificação e quantificação do alfa-tocoferol nas amostras foram estabelecidas por comparação da área do pico obtido no cromatograma com a área do respectivo padrão de alfa-tocoferol Sigma®, em concentração de 0,29 µmol/L, confirmada pelo coeficiente de extinção específico (ϵ 1%, 1 cm = 75,8 a 292 nm).¹²

A sensibilidade do método foi verificada pela determinação do limite de detecção, atingido na concentração de 0,03 µmol/L de alfa-tocoferol. O coeficiente de variação foi de 0,01% na concentração de 0,29 µmol/L para o padrão e 0,05% na concentração de 41 µmol/L para amostras de leite. A exatidão do método foi avaliada por meio do teste de recuperação, que evidenciou taxa de recuperação média de alfa-tocoferol de 109%. A curva de calibração foi realizada usando soluções padrão do alfa-tocoferol (Sigma®). A linearidade do método analítico confirmou-se pela determinação da significância estatística do coeficiente de curva de calibração na concentração de 0,03 a 0,8 µmol/L ($r=0,9998$).

Para estimar o fornecimento de vitamina E para o neonato, comparou-se a ingestão de leite diária com a AI de vitamina E equivalente a 4 mg/dia. Adotou-se a ingestão de 396 mL para o leite colostro¹³ e de 780 mL/dia para as outras fases da lactação, conforme adotado pelo Institute of Medicine (IOM).¹⁰

O tamanho da amostra foi calculado mediante o *software* G*Power, versão 3.1.9.2, em que o resultado foi de no mínimo 58 participantes para o teste bicaudal com nível de significância de 95%, poder=0,8 e medida de efeito=0,35.¹⁴

Os resultados foram expressos em média (desvio padrão). O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar a distribuição da normalidade das amostras. Para averiguar a diferença entre as médias dos diferentes leites (colostro, de transição e maduro), foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) com o teste *posthoc* de Tukey. Todas as diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$. O *software* utilizado foi o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 13.0.

RESULTADOS

A população do estudo caracterizou-se pela idade média de 25±5,0 anos, idade gestacional do parto de 39,8±1,2 semanas, nível educacional no segundo grau incompleto (32%), baixa

renda familiar, ser múltipara e por parte das entrevistadas ser beneficiária de programas governamentais (37%) (Tabela 1).

A concentração média de alfa-tocoferol diminuiu ao longo da lactação, sendo encontrado 40,5±15,0 µmol/L no leite colostro, 13,9±5,2 µmol/L no leite de transição e 8,0±3,8 µmol/L no leite maduro de 30 dias após o parto ($p<0,001$) (Figura 1). Considerando o consumo potencial diário de leite de 396 mL/dia no tempo colostro e 780 mL/dia para os leites de transição e

Tabela 1 Características gerais das 100 lactantes atendidas para o parto no Hospital Universitário Ana Bezerra, Santa Cruz, Rio Grande do Norte.

Características maternas	Resultados média±DP
Idade, em anos ^a	25,0±5,0
Idade gestacional no parto, em semanas ^a	39,8±1,2
Características maternas	Resultados n (%)
Estado civil ^b	
Solteira	19 (19,6)
Casada/reside com o companheiro	78 (80,4)
Escolaridade materna ^c	
Semianalfabeta	3 (3,1)
Alfabetizada	8 (8,3)
Ensino fundamental	23 (24,0)
Segundo grau incompleto	32 (33,3)
Segundo grau completo	25 (26,1)
Terceiro grau	5 (5,2)
Renda familiar ^{b,d} (salário-mínimo)	
<1	65 (67,0)
1-2	25 (25,8)
2-5	7 (7,2)
Número de filhos ^b – média±DP	1,8±1,1
Tipo de parto ^b	
Normal	78 (80,4)
Cesário	19 (19,6)
Beneficiária de programa social ^b	37 (38,1)

^aInformação disponível para 98 casos; ^binformação disponível para 97 casos; ^cinformação disponível para 96 casos; ^drenda mensal dividida pelo número de moradores do domicílio. Salário-mínimo do Brasil equivalente a R\$ 724,00.

maduro, o colostro forneceu 6,2 mg/dia, e os leites de transição e maduro, 4,7 e 2,7 mg/dia, respectivamente ($p < 0,0001$).

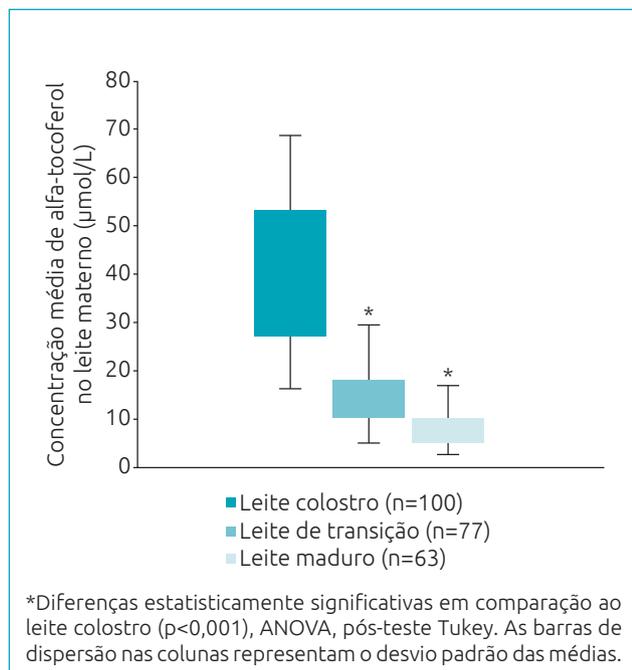


Figura 1 Concentração média de alfa-tocoferol no leite materno em diferentes períodos de lactação.

O fato evidenciou que o leite colostro, mesmo em menor volume ingerido, forneceu maiores quantidades de vitamina E ao lactente. Ao comparar a provável ingestão diária de leite com a recomendação nutricional da vitamina (4 mg/dia), observou-se que apenas o leite maduro não atingiu a AI proposta para o lactente menor de seis meses (Figura 2).

DISCUSSÃO

O aleitamento materno é de extrema importância para a saúde do neonato, por conta de sua ação na diminuição da prevalência de doenças infecciosas, diarreia e mortalidade infantil e do risco de alergias à proteína do leite, além de sua atuação protetora em longo prazo.¹⁵ Em relação à vitamina E, as crianças amamentadas apresentam maiores níveis de alfa-tocoferol circulante, essencial nessa fase da vida para o desenvolvimento dos sistemas imunológico e pulmonar, a montagem da matriz extracelular do sistema vascular e o desenvolvimento mental, além da prevenção de anemia hemolítica e displasia broncopulmonar.¹⁶⁻¹⁸

De forma geral, ao comparar os resultados com a literatura, percebe-se que os níveis da vitamina nos leites estão de acordo com estudos envolvendo lactantes de países desenvolvidos e em situações de segurança alimentar.⁷ A concentração de alfa-tocoferol no leite colostro foi superior à de lactantes polonesas,⁶

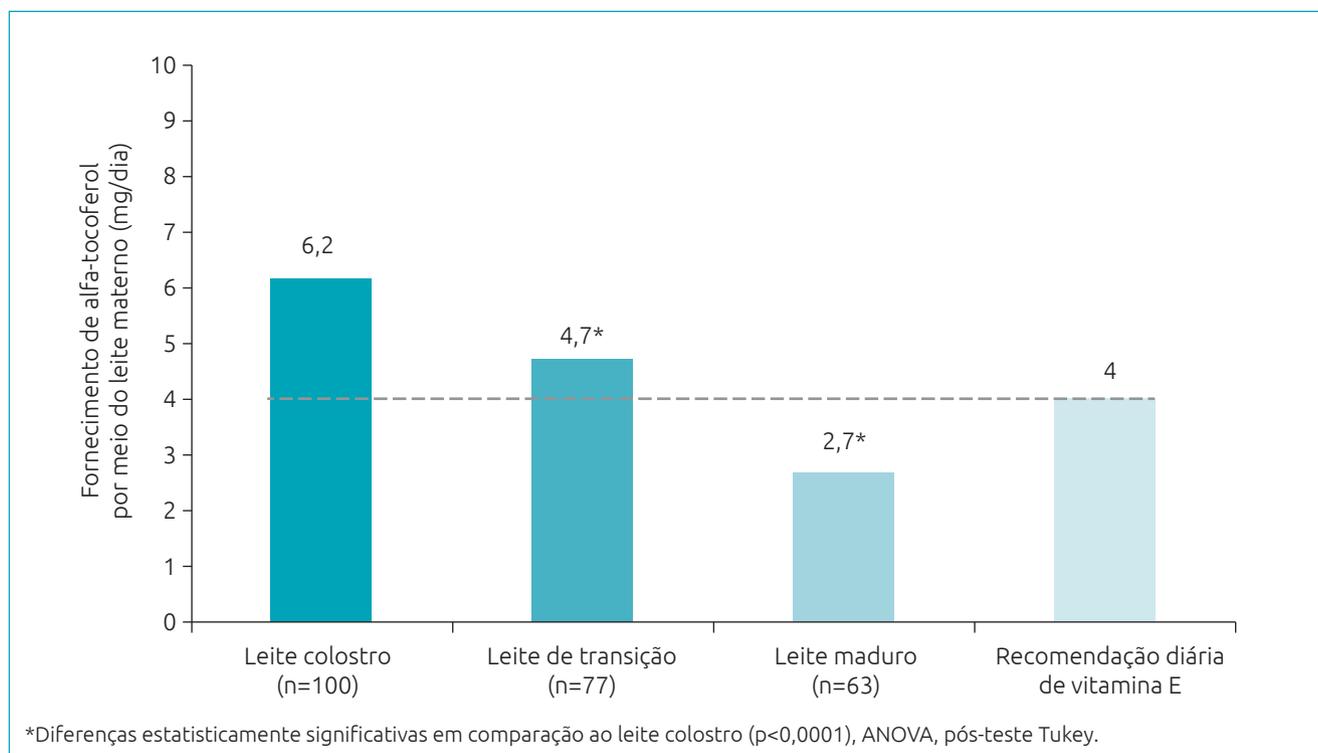


Figura 2 Estimativa da ingestão média de vitamina E por lactentes no decorrer da lactação, considerando o volume de leite ingerido ao dia.

inferior ao estudo realizado na Espanha⁹ e semelhante à concentração encontrada no Brasil.^{19,20} Quanto aos leites de transição e maduro, a concentração média encontrada foi semelhante a um estudo longitudinal também realizado no Brasil⁸ (Tabela 2).

Szlagatys-Sidorkiewicz et al.⁶ sugerem que maiores concentrações de alfa-tocoferol no colostro atuam como um mecanismo compensatório, visto que maior aporte dessa vitamina é necessário nos primeiros dias de vida em função do aumento do estresse oxidativo no momento do parto, quando o neonato entra em contato com um ambiente hiperoxêmico e necessita de compostos antioxidantes para evitar a peroxidação lipídica das membranas. Outro fato a acrescentar é a baixa reserva corporal da vitamina ao nascer em virtude da limitada transferência placentária.^{1,21}

A diminuição dos níveis de alfa-tocoferol no leite é explicada pelo fato de que, após os primeiros dias de lactação, a síntese e a secreção de triglicerídeos aumentam, sem haver aumento proporcional na secreção de fosfolípidios e de outros componentes da membrana dos glóbulos de gordura. Dessa forma, há redução significativa nos níveis do alfa-tocoferol, uma vez que maior parte dessa vitamina é secretada como um constituinte da membrana desses glóbulos.²

Na fase do leite maduro, o leite materno deixa de sofrer grandes variações na sua composição, fazendo com que os níveis de alfa-tocoferol passem a se manter constantes ao longo do tempo.⁷ Antonakou et al.¹⁷ evidenciaram não haver diferença significativa entre as concentrações de alfa-tocoferol no leite maduro entre o primeiro, o terceiro e o sexto mês de lactação. Os dados do presente estudo podem ser representativos do seguimento da lactação.

Embora a quantidade de alfa-tocoferol ofertada ao lactente seja reduzida com o avanço das fases de lactação, destaca-se haver aumento do volume de leite consumido pelo recém-nascido com o decorrer do tempo para suprir o seu requerimento

nutricional.⁷ Neste estudo, o leite maduro não forneceu a AI de vitamina E para o lactente. Antonakou et al.¹⁷ e Kamao et al.²² também demonstraram que os níveis de alfa-tocoferol, ao atingirem o estágio de leite maduro, forneceram quantidade inferior à recomendação nutricional da vitamina, fato justificado pelo declínio natural na composição dessa vitamina no leite. Este estudo não avaliou os possíveis determinantes para a baixa concentração de alfa-tocoferol no leite, e a literatura não demonstra claramente se a dieta ou o *status* de vitamina E materno pode influenciar essa composição.⁷

É importante ressaltar que a recomendação do IOM é baseada na quantidade média de leite ingerida pelos lactentes de 0 a 6 meses de vida (780 mL), sem considerar as alterações na produção de leite materno durante as fases de lactação.¹⁰ Traber²³ afirma que a quantidade de vitamina E recomendada para consumo diário ainda é controversa, podendo ser inadequada para alguns grupos populacionais. Diante disso, mais investigações acerca dos fatores que podem afetar a composição de alfa-tocoferol no leite materno durante a lactação são importantes para fornecer subsídios no estabelecimento das ingestões dietéticas de referência e como critério na avaliação do consumo de vitamina E por lactentes.

Os benefícios do aleitamento materno para o lactente são indiscutíveis, uma vez que o leite humano apresenta composição nutricional balanceada, proporcionando melhor biodisponibilidade de nutrientes, além de conter fatores de crescimento, enzimas e hormônios que fornecem inúmeras vantagens imunológicas e psicológicas, diminuição da morbidade e mortalidade infantil, entre outros benefícios à saúde em longo prazo.²⁴⁻²⁶

Considerando-se que o presente estudo constatou diminuição na concentração de alfa-tocoferol no leite materno com o avanço dos estágios de lactação e a provável menor oferta da vitamina ao lactente no estágio de leite maduro, sugere-se o desenvolvimento de estudos que avaliem os fatores determinantes

Tabela 2 Estudos longitudinais com valores de alfa-tocoferol em leite humano de diferentes fases da lactação.

Autoria/Ano	País	Alfa-tocoferol no colostro*	Alfa-tocoferol no leite de transição*	Alfa-tocoferol no leite maduro*
Campos (2005) ⁸ n=18	Brasil	30,5±8,5	9,1±4,0	9,1±1,6
Quiles et al. (2006) ^{9**} n=15	Espanha	57,0	38,0	20,0
Martysiak-Zurowska et al. (2013) ⁴ n=48	Polônia	23,2±3,5	10,3±2,2	6,8±2,0
Presente estudo (2016) n=100	Brasil	40,5±15,0	13,9±5,2	8,0±3,8

*Valores em µmol/L, referidos como média±desvio padrão; **o artigo não informa o valor do desvio padrão.

associados a esses baixos níveis no leite. Outra questão importante é estimular a assistência nutricional do binômio mãe-filho no seguimento da lactação para combater uma possível deficiência dessa vitamina, seja por meio do estímulo ao consumo de seus alimentos fonte, seja pela possível suplementação materna com essa vitamina, uma vez que há evidências de que a suplementação materna no pós-parto pode refletir em aumento na concentração de alfa-tocoferol no leite materno.²⁷ Não há orientação de suplementar a criança com vitamina E no seguimento da lactação, mesmo porque a sua deficiência é pouco explorada na literatura.

Por fim, este trabalho demonstrou que a vitamina E diminui no leite humano com o progredir da lactação e que

apenas o leite maduro não forneceu o requerimento nutricional do lactente, segundo estimativa de volume ingerido de 780 mL/dia. Dessa forma, a aplicação de condutas para aumentar os níveis da vitamina no leite seria importante especialmente para lactantes vivendo em condições de insegurança alimentar.

Financiamento

Recursos do Programa de Pós-graduação em Bioquímica da UFRN.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Debier C, Larondelle Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br J Nutr.* 2005;93:153-74.
2. Debier C. Vitamin E during pre- and postnatal periods. *Vitam Horm.* 2007;76:357-73.
3. Fares S, Feki M, Khouaja-Mokrani C, Sethom MM, Jebnoun S, Kaabachi N. Nutritional practice effectiveness to achieve adequate plasma vitamin A, E and D during the early postnatal life in Tunisian very low birth weight infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;28:1324-8.
4. Martysiak-Zurowska D, Szlagatys-Sidorkiewicz A, Zagierski M. Concentrations of alpha- and gamma-tocopherol in human breast milk during the first months of lactation and in infant formulas. *Matern Child Nutr.* 2013;9:473-82.
5. Tokusoglu O, Tansug N, Aksit S, Dinc G, Kasirga E, Ozcan C. Retinol and alpha-tocopherol concentrations in breast milk of Turkish lactating mothers under different socio-economic status. *Int J Food Sci Nutr.* 2008;59:166-74.
6. Szlagatys-Sidorkiewicz A, Zagierski M, Jankowska A, Łuczak G, Macur K, Baczek T, et al. Longitudinal study of vitamins A, E and lipid oxidative damage in human milk throughout lactation. *Early Hum Dev.* 2012;88:421-4.
7. Lima MS, Dimenstein R, Ribeiro KD. Vitamin E concentration in human milk and associated factors: a literature review. *J Pediatr (Rio J).* 2014;90:440-8.
8. Campos JM. Perfil dos níveis de vitaminas A e E no leite de doadoras primíparas e múltiparas em bancos de leite humano [master's thesis]. Recife (PE): UFPE; 2005.
9. Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, Linde J, Bompadre S, Battino M, et al. Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Free Radic Res.* 2006;40:199-206.
10. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington: National Academies Press; 2000.
11. Ortega RM, López-Sobaler AM, Martínez RM, Andrés P, Quintas ME. Influence of smoking on vitamin E status during the third trimester of pregnancy and on breast-milk tocopherol concentrations in Spanish women. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:662-7.
12. Nierenberg DW, Nann SL. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue sample. *Am J Clin Nutr.* 1992;56:417-26.
13. Bauer J, Gerss J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clin Nutr.* 2011;30:215-20.
14. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 2007;39:175-91.
15. Horta BL, Bahl R, Martines JC, Victora CG. Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic reviews and meta-analyses. Geneva: World Health Organization; 2007.
16. Villacorta L, Azzi A, Zingg JM. Regulatory role of vitamins E and C on extracellular matrix components of the vascular system. *Mol Aspects Med.* 2007;28:507-37.
17. Antonakou A, Chiou A, Andrikopoulos NK, Bakoula C, Matalas AL. Breast milk tocopherol content during first six months in exclusively breastfeeding Greek women. *Eur J Nutr.* 2011;50:195-202.
18. Kitajima H, Kanazawa T, Mori R, Hirano S, Ogihara T, Fujimura M. Long-term alpha-tocopherol supplements may improve mental development in extremely low birthweight infants. *Acta Paediatr.* 2015;104:e82-9.
19. Dimenstein R, Medeiros AC, Cunha LR, Araújo KF, Dantas JC, Macedo TM, et al. Vitamin E in serum and human colostrum under fasting and postprandial conditions. *J Pediatr (Rio J).* 2010;86:345-8.
20. Clemente HA. Avaliação da suplementação com vitamina E, na forma natural ou sintética, em mulheres no pós-parto imediato e sua concentração no colostro [master's thesis]. Natal (RN): UFRN; 2013.

21. Schweigert FJ, Bathe K, Chen F, Büscher U, Dudenhausen JW. Effect of the stage of lactation in humans on carotenoid levels in milk, blood plasma and plasma lipoprotein fractions. *Eur J Nutr.* 2004;43:39-44.
22. Kamao M, Tsugawa N, Suhara Y, Wada A, Mori T, Murata K, et al. Quantification of fat-soluble vitamins in human breast milk by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;859:192-200.
23. Traber MG. Vitamin E. In: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH, editors. *Present knowledge in nutrition.* 10th ed. Washington: ILSI Press; 2012. p. 214-29.
24. Cyrillo DC, Sarti FM, Farina EM, Mazzon JA. Duas décadas da Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes: há motivos para comemorar? *Rev Panam Salud Publica.* 2009;25:134-40.
25. Marseglia L, Mantia S, D'Angelo G, Cuppari C, Salpietro V, Filippelli M, et al. Obesity and breastfeeding: the strength of association. *Women Birth.* 2015;28:81-6.
26. Victora CG, Horta BL, Mola CL, Quevedo L, Pinheiro RT, Gigante DP, et al. Association between breastfeeding and intelligence, educational attainment, and income at 30 years of age: a prospective birth cohort study from Brazil. *Lancet Glob Health.* 2015;3:e199-205.
27. Clemente HA, Ramalho HM, Lima MS, Grilo EC, Dimenstein R. Maternal supplementation with natural or synthetic vitamin E and its levels in human colostrum. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015;60:533-7.