

Evaluation of retinol levels in human colostrum in two samples collected at an interval of 24 hours

Avaliação dos níveis de retinol no colostro humano coletado no intervalo de 24 horas

Karla D. S. Ribeiro¹, Katherine F. Araújo², Michelle C. Pereira², Roberto Dimenstein³

Resumo

Objetivo: Avaliar a concentração de retinol no colostro coletado em intervalo de 24 h.

Métodos: Coletou-se o colostro de 24 puérperas em dois períodos, tempo zero (T0) e tempo 24 h (T24), e um *pool* da união de T0 e T24. A gordura foi determinada pelo crematócrito, e o retinol por cromatografia líquida de alta eficiência.

Resultados: Quando expresso por volume de leite ($\mu\text{g}/\text{dL}$), o nível de retinol sofreu variações entre T0, T24 e *pool*: $94,9 \pm 58,9$; $129 \pm 78,6$ e $111,9 \pm 60,4$ $\mu\text{g}/\text{dL}$, respectivamente. Entretanto, quando expresso pela quantidade de gordura ($\mu\text{g}/\text{g}$), não foi observada diferença significativa.

Conclusões: O retinol quantificado no colostro através de coleta única não deve ser utilizado como indicador do estado nutricional em vitamina A, devido à grande variabilidade no decorrer das coletas. Sugere-se que os resultados sejam expressos por grama de gordura, para minimizar as variações em decorrência do volume de leite.

J Pediatr (Rio J). 2007;83(4):377-380: Retinol, colostro, gordura.

Introdução

A composição do leite humano varia nas 2 primeiras semanas de lactação, tornando-se constante em relação a alguns nutrientes no primeiro mês pós-parto. O primeiro produto da secreção é o colostro, produzido nos primeiros dias após o parto. Do quinto ao 21º dia, passa a ser denominado leite de transição, para posteriormente ser chamado de

Abstract

Objective: To evaluate retinol concentration in colostrum samples collected with a 24 hour interval.

Methods: Colostrum was collected from 24 recently-delivered mothers at two points in time, 0 hours (T0) and 24 hours later (T24), and a pooled sample of colostrum from T0 and T24 was also analyzed. Fat content was determined by creatocrit, and retinol assayed by High Performance Liquid Chromatography.

Results: When expressed in terms of volume of milk ($\mu\text{g}/\text{dL}$), retinol levels varied across T0, T24 and the pooled sample: 94.9 ± 58.9 ; 129 ± 78.6 and 111.9 ± 60.4 $\mu\text{g}/\text{dL}$, respectively. However, when expressed with relation to fat content ($\mu\text{g}/\text{g}$), no significant difference was observed.

Conclusions: Retinol assayed in colostrum from a single sample should not be used as an indicator of vitamin A nutritional status, due to the great variation between samples collected at different times. It is suggested that results be expressed per gram of fat, in order to minimize variations resulting from the volume of milk.

J Pediatr (Rio J). 2007;83(4):377-380: Retinol, colostrum, fat.

leite maduro^{1,2}. O colostro tem composição nutricional particularmente distinta, sendo rico em vitaminas lipossolúveis³.

Além de sofrer influência dos estágios de lactação, a vitamina A no leite pode ser alterada pelo conteúdo de gordura, no transcorrer da mamada, bem como por aspectos individuais das lactantes⁴⁻⁹.

1. Nutricionista. Mestranda, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN. Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, UFRN, Natal, RN.
2. Acadêmica de Nutrição, UFRN, Natal, RN.
3. Professor adjunto IV, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, UFRN, Natal, RN.

Artigo submetido em 18.09.06, aceito em 13.12.06.

Como citar este artigo: Ribeiro KD, Araujo KF, Pereira MC, Dimenstein R. Evaluation of retinol levels in human colostrum in two samples collected at an interval of 24 hours. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(4):377-380.

Trabalho baseado nos resultados preliminares do projeto de mestrado intitulado "Avaliação do efeito da suplementação materna de vitamina A no pós-parto imediato", 2005-2006, do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN.

Agência financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 401793/2005-2.

doi 10.2223/JPED.1646

Apesar do retinol no colostro ser bastante variável, alguns autores sugerem que ele pode ser indicativo do estado nutricional em vitamina A, pois a análise deste nutriente no leite não é invasiva e o acesso é mais fácil¹⁰. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que, para que o retinol no leite seja considerado representativo, amostras de leite devem ser coletadas ao longo de 24 h, e não em coletas casuais, uma vez que os valores de retinol expressos por volume de leite podem ser sensíveis a erros de amostragem¹¹. Entretanto, coletar o leite ao longo de 24 h torna-se inviável na prática e, dessa forma, seriam necessárias alternativas exequíveis de coleta de leite ou na forma de expressar os valores de retinol, para minimizar as variações existentes.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a concentração de retinol no colostro expresso por volume de leite e por grama de gordura em dois momentos de coleta com intervalo de 24 h.

Métodos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa. O experimento ocorreu entre os meses de janeiro e fevereiro de 2006 e teve como participantes 24 puérperas saudáveis, selecionadas randomicamente, atendidas na Maternidade Escola Januário Cicco, Natal (RN), entre 18-40 anos, gestação única a termo sem má-formação, com até 12 h após o parto. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no módulo Statcalc do programa Epi-Info 3.32. Considerando uma média de 250 partos por mês, para um nível de confiança de 95%, estimou-se um tamanho de amostra de, no mínimo, 25 sujeitos.

Após o consentimento livre e esclarecido, coletou-se uma amostra de colostro que foi fracionada em dois tubos, sendo um chamado de tempo 0 h e outro que posteriormente recebeu o nome de *pool*. Outra amostra de leite foi coletada com intervalo de 24 h a partir da primeira coleta. Esta alíquota também foi fracionada, sendo posta em tubo chamado de tempo 24 h, e a outra foi reunida ao mesmo tubo *pool* da primeira coleta.

O colostro foi coletado por expressão manual de única mama não sugada previamente. A primeira ejeção do leite foi desprezada para evitar flutuações no teor de retinol. As amostras continham entre 1 e 3 mL e foram transportadas ao laboratório de bioquímica em recipiente com gelo.

O teor de gordura foi determinado pelo crematócrito¹². Em seguida, com a quantidade de leite restante, realizou-se a extração de retinol segundo método de Giuliano et al.¹³ modificado, conforme descrito a seguir.

O volume total do leite coletado foi utilizado na extração do retinol como forma de prevenir a redução do conteúdo desta vitamina, uma vez que, quando se utiliza alíquota de leite para esta análise, parte do retinol pode ser perdida pela precipitação dos glóbulos de gordura, que, com o tempo, ten-

dem a sair de emulsão¹⁴. Após quantificar o volume de leite coletado, foram acrescentados nas amostras hidróxido de potássio 50% v/v (Vetec) e álcool etílico 95% (Vetec), para a etapa de hidrólise alcalina. A proporção desses reagentes foi a seguinte: para cada 1 mL de leite, foram adicionados 2 mL de KOH 50% e 1 mL de álcool etílico 95%. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas durante 1 min e submetidas a banho-maria sob agitação a 45 °C por 2 h. Utilizou-se como reagente extrativo 2 mL de hexano (Merck), repetindo o processo três vezes. Após cada adição de hexano, as amostras foram agitadas durante 1 min e centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min e a camada hexânica removida para outro tubo.

Uma alíquota de 3 mL da fase hexânica foi evaporada sob atmosfera de nitrogênio em banho-maria a 37 °C. Os extratos foram ressuspensos em 1 mL de metanol (Vetec) em grau de pureza para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A concentração de retinol das amostras foi determinada por CLAE em cromatógrafo LC-10 AD Shimadzu, acoplado a um detector SPD-10 A Shimadzu UV-VIS e integrador Chromatopac C-R6A Shimadzu, com uma coluna LC Shim-pack CLC-ODS (M) de 4,6 mm x 25 cm. O cromatograma evoluiu nas seguintes condições: fase móvel metanol 100% e fluxo 1,0 mL/min.

O teste de recuperação foi realizado com a adição de retinol acetato nas amostras de leite, resultando em mais de 99% de aproveitamento.

A identificação e quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação com o tempo de retenção e a área do padrão de *all-trans retinol* - SIGMA. A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico (ϵ 1%, 1 cm = 1.750) em etanol absoluto (Vetec) e comprimento de onda de 325 nm.

Os valores de retinol no leite foram expressos em $\mu\text{g/dL}$ e também em $\mu\text{gROH/g}$ de gordura. Este último valor foi obtido pela divisão da concentração de retinol por volume de leite ($\mu\text{g/dL}$) pela concentração de gordura (g/dL). Valores $\leq 30 \mu\text{g/dL}$ e $\leq 8 \mu\text{gROH/g}$ de gordura são considerados indicativos de baixa concentração de retinol no leite¹¹.

Para testar as diferenças entre as médias, foi utilizado o teste *t* de Student para amostras dependentes. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Quando expresso por volume de leite ($\mu\text{g/dL}$), o nível de retinol sofreu variações ($p < 0,05$) entre os distintos momentos de coleta (Tabela 1).

No entanto, quando as concentrações de retinol foram expressas em função da gordura presente no leite, os níveis de retinol mantiveram-se estáveis, demonstrando valores de

Tabela 1 - Níveis de retinol e gordura (média ± desvio padrão; n = 24) no leite de acordo com o tempo de coleta

Tempo de coleta	Retinol (µg/dL)	Retinol (µg/g de gordura)	Gordura (g/dL)
Leite 0 h	94,9±58,9*	44,2±38,4	2,9±1,7
Leite 24 h	129,0±78,6	46,8±38,3	3,5±2,3
Leite <i>pool</i>	111,9±60,4 [†]	43,0±31,9	3,2±1,5

* Diferença significativa entre o leite 0 h e 24 h. Teste t de Student (p < 0,023).

[†] Diferença significativa entre o leite 0 h e *pool*. Teste t de Student (p < 0,02).

44,2±38,4, 46,8±38,3 e 43,0±31,9 µgROH/g de gordura para o leite 0 h, 24 h e no *pool* (p > 0,05).

Nenhuma diferença estatística foi encontrada nos valores de gordura (Tabela 1).

Discussão

O nível de retinol no colostro das mulheres estudadas está de acordo com o encontrado na literatura¹⁵.

De acordo com os parâmetros estabelecidos pela OMS², não houve deficiência de vitamina A no leite materno.

Quando expresso por volume de leite, observou-se uma grande variação na concentração de retinol ao longo das coletas; entretanto, os valores no *pool* foram mais próximos dos valores de vitamina A relatados na literatura¹⁵ (Tabela 1).

Não houve diferença na concentração de retinol quando os resultados foram expressos por grama de gordura. Esta forma de representar o retinol no leite é utilizada no intuito de controlar a variação nas concentrações de retinol induzidas por amostragem e por ser lipossolúvel. Ou seja, o volume de leite secretado no decorrer da lactação é mais variável que os níveis de gordura e pode causar alterações nos resultados¹¹.

Ao contrário do retinol no leite, neste estudo foi possível observar que o nível de gordura se manteve constante independente do momento de coleta, confirmando que o lipídeo é mais estável no volume de leite do que a vitamina A, apesar de boa parte dessa vitamina estar localizada nos glóbulos de gordura. Com isso, alguns estudos sugerem que a transferência desses componentes ao colostro se dá por mecanismos específicos distintos¹⁵.

O retinol presente no leite materno é utilizado por alguns estudos como um indicador do estado nutricional de vitamina

A e como avaliação do impacto de programas de suplementação materna de vitamina A^{5,9,10}.

A OMS¹¹ recomenda que, quando não é possível coletar todo o leite de 24 h, é necessário expressar os resultados do retinol por grama de gordura, já que este tipo de abordagem é menos passível de variações do que quando expressos por volume de leite. Esse fato foi confirmado por nossos resultados.

Rice et al.⁵ encontraram, em amostras casuais, que o conteúdo de vitamina A expresso por grama de gordura refletiu melhor a resposta à suplementação materna de vitamina A do que quando expresso por volume de leite, recomendando que o teor lipídico do leite deva ser sempre analisado.

Os resultados encontrados alertam que o retinol no colostro de coletas únicas não deve ser utilizado como indicador do estado nutricional em vitamina A, devido à grande variabilidade deste nutriente no decorrer de diferentes tempos de coleta. Para minimizar este problema, sugere-se utilizar *pool* ou expressar os resultados por grama de gordura, além de, por exemplo, sempre associar o retinol no leite com outros tipos de análises, como retinol sérico e inquéritos dietéticos.

Agradecimento

Agradecemos à Maternidade Escola Januário Cicco, Natal (RN), onde o estudo foi realizado.

Referências

1. Breastfeeding and the use of human milk. American Academy of Pediatrics. Work Group on Breastfeeding. *Pediatrics*. 1997;100:1035-9.
2. Euclides MP. Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação adequada. 2 ed. Viçosa: Metha; 2000.

3. Schweigert FJ, Bathe K, Chen F, Buscher 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.
4. Haskell MJ, Brown KH. Maternal vitamin A nutriture and vitamin A content of human milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1999;4:243-57.
5. Rice AL, Stoltzfus RJ, de Francisco A, Kjolhede CL. Evaluation of serum retinol, the modified-relative-dose-response ratio, and breast-milk vitamin A as indicators of response to postpartum maternal vitamin A supplementation. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:799-806.
6. Nascimento MBR, Issler H. Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. *Rev Hosp Clin Fac Med.* 2003;58:49-60.
7. Ribeiro KDS, Dimenstein R. Níveis de retinol no leite materno ao início e final da mamada. *Rev Panam Salud Publica.* 2004;16:19-22.
8. Melo ILP, Ribeiro KDS, Dimenstein R. Estudo das variações dos níveis de retinol no colostro humano de parturientes a termo e pré-termo. *Rev Bras Saude Mater Infant.* 2004;4:249-52.
9. Meneses F, Trugo NMF. Retinol, β -carotene, and lutein+zeaxanthin in the milk of Brazilian nursing women: associations with plasma concentrations and influences of maternal characteristics. *Nutr Res.* 2005;25:443-51.
10. Stoltzfus RJ, Underwood BA. Breast-milk vitamin A as an indicator of the vitamin A status of women and infants. *Bull World Health Organ.* 1995;73:703-11.
11. World Health Organization, Nutrition Unit. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. (WHO/NUT/96.10). Geneva: WHO; 1996.
12. Lucas A, Gibbs JA, Lyster RL, Baum JD. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *Br Med J.* 1978;1:1018-20.
13. Giuliano AR, Neilson EM, Kelly BE, Canfield LM. Simultaneous quantitation and separation of carotenoids and retinol in human milk by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* 1992;213:391-9.
14. Góes HC, Torres AG, Donangelo CM, Trugo NM. Nutrient composition of banked human milk in Brazil and influence of processing on zinc distribution in milk fractions. *Nutrition.* 2002;18:590-4.
15. Macias C, Schweigert FJ. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann Nutr Metab.* 2000;45:82-5.

Correspondência:
Roberto Dimenstein
Departamento de Bioquímica – Centro de Biociências
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Av. Senador Salgado Filho, 3000, Bairro Lagoa Nova
CEP 59072-970 – Natal, RN
Tel.: (84) 3215.3416, ramal 212
Fax: (84) 3211.9208
E-mail: robertod@ufrnet.br