

# Determinação de vitamina A no leite materno por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Botucatu, SP, Brasil

## *Vitamin A determination in human milk by high performance liquid chromatography (HPLC), Botucatu, SP, Brazil*

### ABSTRACT

CASSETTARI, M.L.; DIAS, L.C.C.G.; GIAROLA, L.C.; SOUZA, N. V. Vitamin A determination in human milk by high performance chromatography (HPLC) Botucatu, SP, Brazil. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = *J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP. v.25, p. 23-30, jun., 2003.

*Vitamin A deficiency is increasingly being recognized as a public health problem in developing countries. Vitamin A in breast milk can be used as an indicator of the nutritional state (WHO). The aim of this study was to test a method for determining vitamin A in human breast milk. The content of vitamin A was studied in 126 sample of breast milk. Results: fat  $38.0 \pm 13.7\text{g/L}$ , ( $13.0 - 74.0\text{g/L}$ ); vitamin A  $1.6 \pm 0.8\ \mu\text{mol/L}$ , ( $0.09 - 4.0\ \mu\text{mol/L}$ ). In 26% of the samples, milk concentration of vitamin A was not sufficient to meet the infant's metabolic requirements. These results are similar to other researchers, showing that this technique is accurate, fast and may, therefore, aid in the identification of groups of risk.*

**Keywords: vitamin A; HPLC high performance liquid chromatography; human milk; pregnant women**

MARIA LUIZA CASSETTARI<sup>1</sup>; LUIZA CRISTINA C. G. DIAS<sup>2</sup>; LUÍS CARLOS GIAROLA<sup>3</sup>; NELSON DE SOUZA<sup>4</sup>

<sup>1,3,4</sup>Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

<sup>2</sup>UNAERP de Ribeirão Preto

**Endereço para correspondência:**  
Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP  
Distrito de Rubião Jr s/n-Botucatu

São Paulo - Brasil  
CEP 18618-970

e-mail:

mluiza@fmb.unesp.br

**Agradecimentos**

À FINEP pelo apoio financeiro.

Processo 6/4/96/053500

## RESUMEN

*La carencia de vitamina A ha sido reconocida como un problema de salud pública en muchos países. La concentración de vitamina A en la leche materna puede ser usada como indicador del estado nutricional (WHO). El objetivo de este trabajo fue analizar vitamina A en leche materna. En las 126 muestras analizadas fueron encontrados los siguientes valores: grasa  $38.0 \pm 13.7$ g/L, (13.0 - 74.0g/L); vitamina A  $1.6 \pm 0.8$  $\mu$ mol/L, (0.09 - 4,0 $\mu$ mol/L), siendo que 26% no atienden el requerimiento de los recién nacidos. Los resultados, similares a los de otros estudios, sugieren que la técnica utilizada es precisa, rápida y podría ayudar en la identificación de grupos de riesgo.*

**Palabras clave:** vitamina A; cromatógrafo líquido de alto desempeño; HPLC; leche materna; embarazo

## RESUMO

*A deficiência de vitamina A tem sido reconhecida como um problema de saúde pública em muitos países. A vitamina A no leite materno pode ser usada como indicador do estado nutricional (WHO). O objetivo deste estudo foi testar um método para determinação de vitamina A no leite materno. As 126 amostras de leite analisadas mostraram os seguintes resultados: gordura  $38.0 \pm 13,7$ g/L, (13,0 - 74,0g/L); vitamina A  $1,6 \pm 0,8$  $\mu$ mol/L, (0,09 - 4,0 $\mu$ mol/L). Em 26% das amostras a concentração de vitamina A não se mostrou suficiente para as necessidades dos recém-nascidos. Os resultados são similares aos de outros pesquisadores, demonstrando que a técnica utilizada é precisa, rápida e poderá, deste modo, auxiliar na identificação de grupos de risco.*

**Palavras-chave:** vitamina A; CLAE cromatografia líquida de alta eficiência; leite materno; gestante

## **INTRODUÇÃO**

A deficiência de vitamina A aumenta a susceptibilidade a infecções em mães e seus filhos, e é um dos fatores contributivos para um pior desempenho da mulher frente a gestação e amamentação (CASANUEVA et al., 1999). A amamentação é considerada fundamental para a promoção e proteção da saúde das crianças (KUMMER et al., 2000). O leite humano é um fluido complexo que contém mais de 200 constituintes conhecidos. O número destes constituintes aumenta, à medida que as técnicas analíticas se aprimoram (IOM, 1991).

Três aspectos da nutrição materna têm impacto na composição do leite humano: ingestão corrente, estoque de nutrientes e alteração na utilização dos nutrientes (IOM, 1991).

No que diz respeito ao conteúdo de vitaminas no leite humano, sua concentração está diretamente associada ao estado de vitaminas materno. Em geral quando a ingestão é cronicamente baixa, os níveis de vitamina no leite materno também são baixos (IOM, 1991).

A vitamina A pode ser transferida da mãe para a criança por duas vias: passagem através da placenta e secreção do colostro e leite (CASANUEVA et al., 1999; STOLZFUS e UNDERWOOD, 1995). Normalmente a vitamina A é transferida da mãe para o filho sessenta vezes mais durante seis meses de lactação, que a acumulação realizada pelo feto em nove meses de gestação (RAMALHO et al., 1998).

A análise da vitamina A no leite materno é importante, porque a sua concentração neste fluido está relacionada com o estado de vitamina A materno e com a ingestão desta vitamina pela mãe durante a lactação (HASKELL e BROWN, 1999).

## **OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi testar metodologia para determinar a concentração de vitamina A em leite humano maduro, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## **CASUÍSTICA**

O estudo ficou constituído por 126 nutrizas pertencentes a área urbana do município de Botucatu, que forneceram uma amostra de leite. 29,0% eram adolescentes e 5,5% estavam acima dos 35 anos; 63,0% tinham cursado o primeiro grau escolar, 36% eram fumantes, 7% tinham estatura inferior a 150cm. Em relação ao produto gestacional, encontramos 43% do sexo masculino e 57% do sexo feminino e uma incidência de 8% de baixo peso ao nascer.

O leite foi coletado no domicílio, por meio de extração manual, após uma hora da primeira mamada, em frasco esterilizado e protegido da luz, transportado para o laboratório em caixa de isopor com gelo, onde foi armazenado em freezer -85°C até ser analisado.

O estudo teve parecer favorável da comissão de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

## MÉTODOS

### DETERMINAÇÃO DE VITAMINA A

A determinação de vitamina A foi realizada segundo o método descrito por de PEE et al. (1997). O aparelho utilizado foi o cromatógrafo da marca Shimadzu, constituído de duas bombas para liberação do solvente (modelo LC-10AD), desgaseificador (modelo DGU-2A), auto injetor de amostras (modelo SIL-10A), detector UV (modelo SPD-10AV) e a CBM, ou módulo central (modelo 10A). A coluna ODS-C18 (5mm) (25cm x 0,46cm DI) e pré-coluna ODS-C18 (3cm x 0,46cm DI), também Shimadzu. O sistema é todo controlado por computador. O detector foi programado para 325nm, e o auto injetor para 50µl.

Os reagentes acetonitrila, metanol e etanol foram de grau HPLC, o hidróxido de potássio e o ácido acético grau PA. A fase móvel, metanol-água (95:5,v:v). foi filtrada a vácuo e desgaseificada com gás Hélio durante toda a análise, e eluída com fluxo de 1,0ml por minuto. A solução etanólica foi preparada com hidróxido de potássio (4mol/L), (50% por volume), e a acetonitrila (5% de ácido acético por volume). A água utilizada foi ultra pura, proveniente de sistema Milli Q.

O padrão utilizado foi o all-trans-retinol da Sigma (R-7632), com certificado de análise e pureza de 95-97%. A solução estoque foi preparada com etanol na concentração de 1mg/1ml e armazenada em freezer -85°C, e a partir dela construímos a curva, checando as concentrações através de detecção espectrofotométrica (E1%1cm-1780 a 325nm).

A confirmação da identidade da vitamina A foi feita por meio do tempo de retenção (4,57 minutos) (Figura 1). A curva foi construída com quatro pontos: 0,22; 0,45; 0,90 e 1,83 µmol/L (r=0,978) (Figura 2).

Os testes para recuperação (95-97%), limite de detecção (0,088µmol/L) e coeficiente de variação (1,99) foram determinados através de 20 repetições de *pool* de leite humano.

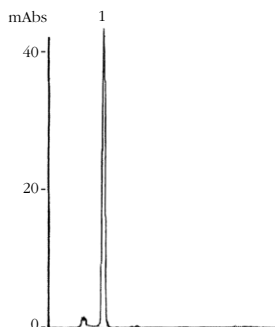
Para determinação da vitamina A no leite materno foi utilizada uma alíquota de 500mL do leite descongelado e homogeneizado, incubado por uma noite, a temperatura ambiente com 500mL de solução etanólica. No dia seguinte foram adicionados 2ml de acetonitrila (contendo 5% de ácido acético por volume) e agitado vigorosamente. Após a separação em duas fases, 50mL da camada superior foram injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). O retinol foi detectado espectrometricamente a 325nm (Figura 3), e quantificado em relação à área do pico da curva de calibração. Todo o procedimento transcorreu em ausência de luz.

## DETERMINAÇÃO DE GORDURA

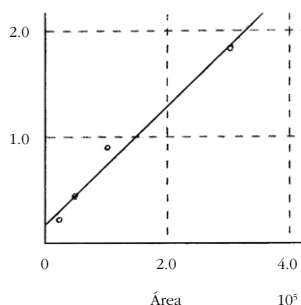
Foi utilizado o método do crematócrito, análogo ao hematócrito. (LUCAS et al., 1978)

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

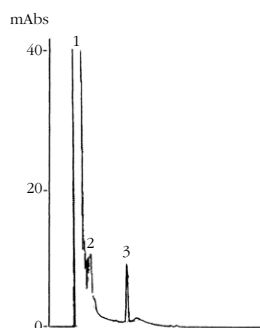
Para a realização da análise descritiva dos resultados utilizou-se o pacote estatístico *Sigma Stat for Windows versão 2.0* da Jandel Statistical Software.



**Figura 1** Determinação do padrão all-trans-retinol, em coluna ODS-C18. Pico 1=retinol (detecção a 325nm)



**Figura 2** Curva padrão do all-trans-retinol, com quatro pontos: 0,22; 0,45; 0,90 e 1,83 $\mu$ mol/L ( $r=0,978$ )



**Figura 3** Separação da vitamina A (retinol) no leite materno, em coluna ODS-C18. Picos 1 e 2=desconhecidos e 3=retinol (detecção a 325nm)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das medidas descritivas relativas à vitamina A e gordura encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1** Medidas descritivas dos componentes analisados no leite materno

	V. Mínimo	Q1	Mediana	Q3	V. Máximo	Média	DP
Gordura g/L	13,0	28,2	36,0	46,0	74,0	38,0	13,7
Vitamina A por volume $\mu\text{mol/L}$	0,09	1,0	1,4	2,0	4,0	1,6	0,8
Vitamina A por grama de gordura $\mu\text{g/g}$	0,6	7,7	11,0	15,2	45,4	12,4	7,3

V. -Valor, Q1-Percentil 25, Q3-Percentil 75, DP- Desvio-Padrão

Os nossos resultados mostram que o conteúdo de gordura no leite variou de 13,0 a 74,0g/L com a média de 38,0g/L. Uma fonte de variação da concentração de gordura na amostra está relacionada com a quantia de leite acumulada pela glândula mamária, ou seja, quanto maior o acúmulo de leite no momento da coleta, menor a concentração de gordura; uma segunda fonte de variação de gordura é o horário. No meio da manhã encontram-se os maiores valores (STOLZFUS e UNDERWOOD, 1995). Uma possível explicação para a variação nas concentrações de gordura, é que nem sempre era possível seguir o horário padronizado e obter o leite após a primeira mamada, ou seja, com o peito vazio.

Com relação aos níveis de vitamina A, os valores encontrados variaram de 0,09 a 4,0 $\mu\text{mol/L}$ , com média de 1,6  $\pm$  0,8 $\mu\text{mol/L}$ . Quando estas concentrações são expressas em relação ao conteúdo de gordura os valores apresentaram valores mínimo e máximo, respectivamente, de 0,6 e 45,4 $\mu\text{g/g}$  de gordura com média de 12,4  $\pm$  7,3 $\mu\text{g/g}$  de gordura.

A concentração de vitamina A no leite materno depende do estado de vitamina A da mãe. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recentemente recomendou que a concentração de vitamina A no leite materno seja usada para avaliar a prevalência desta em comunidades, como também monitorar o impacto de programas de intervenção. A OMS também estabeleceu que concentrações de vitamina A no leite materno  $\leq$  1,05 $\mu\text{mol/L}$  e  $\leq$  8,0 $\mu\text{g/g}$  de gordura sejam indicativos de baixa concentração de vitamina A no leite, e não são adequadas para atender as necessidades do recém-nascido (OMS/UNICEF,1994). Concentrações superiores a 1,75 $\mu\text{mol/L}$  são consideradas suficientes para assegurar os requerimentos dos mesmos (UNDERWOOD,1994).

A análise dos dados mostrou que 26% das amostras de leite tinham concentração menor ou igual a 1,05 $\mu\text{mol/L}$ , 41% entre 1,06 e 1,74 $\mu\text{mol/L}$  e 33% igual ou maior que

1,75µmol/L. Quando consideramos a concentração de vitamina A expressa por grama de gordura detectamos 28% das amostras abaixo de 8mg/grama de gordura. RICE et al. (2000), estudando vitamina A no leite de mulheres provenientes de regiões de alta prevalência de hipovitaminose A, em Bangladesh, encontraram em 24% das mulheres concentração de vitamina A inferior a 1,05µmol/L (RICE et al., 2000). Esta porcentagem está próxima a que encontramos. Podemos concluir que aproximadamente um quarto da amostra estudada, apresentava níveis baixos de vitamina A no leite. Considerando que os recém-nascidos, no período em que se realizou a pesquisa, tinham como única fonte de alimentação o leite materno, existe alta probabilidade dessas crianças apresentarem deficiência de vitamina A, a exemplo do que foi descrito por Ramalho e colaboradores, que encontraram em 55,7% dos recém-nascidos assistidos em duas maternidades públicas do Rio de Janeiro, valores de retinol sérico inferiores a 1,05µmol/L, indicando alta prevalência de hipovitaminose A (RAMALHO et al., 1998).

Sugerimos a realização de mais estudos comparando níveis séricos de retinol da mãe e da criança com níveis de vitamina A no leite materno, para que possamos comprovar se a concentração de vitamina A encontrada no leite reflete o estado de vitamina A da mãe e da criança.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

- CASANUEVA, E.; VALDÉS-RAMOS, R.; PFEFFER, F.; RICALDE-MORENO, A.; GARCIA-VILLEGAS, E.; MESA, C. Retinol sérico en mujeres mexicanas urbanas durante el periodo perinatal. *Salud Pública Méx.*, México, v.41, n.4, p.317-321, 1999.
- HASKELL, M. J.; BROWN, K.H. Maternal vitamin A nutriture and the vitamin A content of human milk. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, New York, v.4, p.243-257, 1999.
- IOM Institute of Medicine. *Milk Composition In: Nutrition during lactation*. Washington DC.: National Academy Press, 1991. cap.6, p. 113-152.
- KUMMER, S.C.; GIUGLIANE, E.R.J.; SUSIN, L.O.; LULIE, O. Evolution of breastfeeding pattern. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.43, n.2, p.143-48, 2000.
- LUCAS, A.; GIBBS, J.A.H.; LISTER, R.L.J.; BAUM, J.D. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *Br. Med. J.*, London, v.1, p. 1018-1020, 1978.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Indicators for assessing vitamin deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. Geneva, Who/Unicef, 1994. 56p.
- PEE, S.; YUNIAR, Y.; WEST, C.E.; MUHILAL. Evaluation of biochemical indicators of vitamin A status in breast-feeding and non-breast-feeding Indonesian. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.66, p.160-7, 1997.
- RAMALHO, A.R.; ANJOS, L.A.; FLORES, H. Hypovitaminosis A in neonates from public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.14, n. 4, p. 821-27, 1998.
- RICE, A.L.; STOLZFUS, R.J.; FRANCISCO, A.; KJOLHEDE, C.L. 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.*, Bethesda, v.71, p.799-806, 2000.

STOLZFUS, R.J.,; UNDERWOOD, B.A. Breast-milk vitamin A as an indicator of the vitamin A status of women and infants. *WHO Bull.* Geneva, v.73, n.5, p.70-11, 1995.

UNDERWOOD, B.A. Maternal vitamin A status and its importance in infancy and early childhood. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.59, Suppl., p.517-524, 1994.

Recebido para publicação em 20/08/02.

Aprovado em 30/06/03.