

Concentração de alfa-tocoferol em colostro humano e em fórmulas infantis e o atendimento ao requerimento nutricional do recém-nascido

Concentration of alpha-tocopherol in human colostrum and infant formulas and the compliance with the newborn nutritional requirement

RIALA6/1563

Larisse Rayanne Miranda de MELO, Heleni Aires CLEMENTE, Roberto DIMENSTEIN*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil. Av. Senador Salgado Filho, 3000, Lagoa Nova, CEP 59072-970 – Natal, RN. Tel.: (84) 32153416, ramal 205. E-mail: rdimenstein@gmail.com
Recebido: 19.02.2013 - Aceito para publicação: 27.09.2013

RESUMO

Os teores de alfa-tocoferol foram determinados no colostro humano e nas fórmulas infantis, para verificar se estas amostras atendem ao requerimento nutricional do recém-nascido quanto à vitamina E. Foi realizado estudo por corte transversal em amostras de 82 lactantes. O colostro foi coletado em jejum imediatamente o pós-parto; e o alfa-tocoferol foi determinado pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As fórmulas infantis foram coletadas em supermercados, selecionando-se quatro marcas (F1, F2, F3, F4) específicas para crianças de 0-6 meses, e as concentrações de alfa-tocoferol indicadas no rótulo. A concentração média de alfa-tocoferol no colostro foi de $1479 \pm 807,7$ $\mu\text{g/dL}$, que corresponde à oferta de 7,3 mg por dia; e nas fórmulas infantis foi de $810 \pm 182,4$ $\mu\text{g/dL}$, equivalente à oferta de 4,1 mg/dia. O leite de colostro forneceu 43 % de alfa-tocoferol a mais do que as fórmulas, e superior em 82 % em relação à recomendação para a faixa etária. A fórmula F3 forneceu apenas 68 % da recomendação diária de alfa-tocoferol e valores acima de 4mg/dia nas demais fórmulas. O colostro forneceu alfa-tocoferol em quantidade superior às fórmulas infantis, e nem todas as fórmulas dispõem alfa-tocoferol em quantidade superior ao recomendado para suprir as necessidades e formar reservas para recém-nascido.

Palavras-chave. alfa-tocoferol, colostro, fórmulas infantis, requerimento nutricional.

ABSTRACT

This study compared the alpha-tocopherol contents in human colostrum and infant formulas, and the vitamin E requirements for newborns were assessed in the both samples. To perform this cross-sectional study, the colostrums samples were collected from 82 lactating women, under fasting conditions, and immediately after postpartum period. Alpha-tocopherol contents were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Four brands of infant formula (F1, F2, F3, and F4), appropriate for children aged 0–6 months, were obtained from a supermarket. The mean alpha-tocopherol concentration in the colostrum was 1479 ± 807.7 $\mu\text{g/dL}$, and in the formulas was 810 ± 182.4 $\mu\text{g/dL}$, which corresponded to the availability of 7.3 mg/day and 4.1 mg/day, respectively. The alpha-tocopherol concentration in colostrum was 43 % higher than that in infant formulas, and 82 % higher than those the age-related recommended contents. The F3 formula contained 68 % of the recommended daily dose of alpha-tocopherol only; and the other formulas showed concentrations of >4 mg/day. Therefore, the colostrum provides alpha-tocopherol in an amount higher than that found in infant formula, and not all of the formulas provided alpha-tocopherol in quantities higher than those recommended to meet the needs and to form alpha-tocopherol reserves for newborns.

Keywords. alpha-tocopherol, colostrum, infant formula, nutritional requirements.

INTRODUÇÃO

O termo vitamina E se refere a um grupo de oito compostos lipossolúveis (α -, β -, γ - e δ -tocoferol e α -, β -, γ - e δ -tocotrienol), sendo que apenas o alfa-tocoferol atende ao requerimento nutricional para humanos¹.

Esta vitamina apresenta-se relevante por ser capaz de exercer efeito protetor sobre o binômio mãe-filho, evitando possíveis danos oxidativos². Concomitante a isso, a deficiência deste micronutriente no recém-nascido tem sido associada à anemia hemolítica e compromete o desenvolvimento do sistema nervoso central, principalmente em pré-termos^{1,3}.

Em função da transferência placentária limitada de vitaminas lipossolúveis, o recém-nascido apresenta reservas corpóreas reduzidas de alfa-tocoferol³. Sendo assim, o leite materno, especialmente o colostro, deverá garantir o fornecimento desse micronutriente em quantidades que sustentem a formação de reservas no recém-nascido, garantam a proteção do organismo contra a toxicidade do oxigênio e estimulem o desenvolvimento do sistema imunológico⁴. Segundo a Dietary Reference Intake (DRI), a quantidade capaz de assegurar o aporte adequado de alfa-tocoferol, bem como a formação de reservas, é de 4 mg/dia para crianças de 0 a 6 meses⁵.

O incentivo ao aleitamento materno apresenta-se como uma medida de prioridade nacional no combate à morbidade e mortalidade infantil por se tratar de uma estratégia eficaz e de baixo custo⁶. A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2001) preconiza o fornecimento exclusivo de leite materno até os seis primeiros meses de vida da criança⁷.

Apesar desta recomendação da OMS, no Brasil há a interrupção precoce desta prática, sendo este um dos mais importantes problemas de saúde pública⁸. Os resultados da II Pesquisa Nacional de Aleitamento Materno⁹ mostraram que apenas 41 % das crianças menores de seis meses de idade são amamentadas, exclusivamente, corroborando com outros estudos nacionais, que apontam frequência elevada de consumo precoce de chás, água, suco, outros leites e fórmulas complementares¹⁰⁻¹². No Nordeste, essa frequência é ainda menor, evidenciando que apenas 37 % das crianças são amamentadas até os seis meses, revelando a menor frequência de amamentação do país⁹. Esse dado é ainda mais preocupante, uma vez que esta é a região com as maiores taxas de mortalidade infantil no Brasil e há inúmeros estudos que revelam associação entre

o uso precoce de outros leites e a morbimortalidade infantil^{13,14}.

Ocorre, portanto, uma introdução precoce de alimentos ou fórmulas que pode acarretar o aumento da morbimortalidade infantil devido à menor ingestão dos fatores de proteção existentes no leite materno, como as imunoglobulinas e micronutrientes antioxidantes¹⁵.

A Resolução RDC n° 43, de 19 de setembro de 2011, da Anvisa, preconiza que essas fórmulas devem ser capazes de satisfazer por si só as necessidades nutricionais dos lactentes durante os seis primeiros meses de vida¹⁶. No entanto, esses produtos estão expostos a fatores como o período e a temperatura de armazenamento, atividade de água, umidade e reconstituição adequada¹⁷. Sendo assim, é esperado que esses alimentos possuam conteúdo de alfa-tocoferol superior ao requerimento diário do recém-nascido compatível com as possíveis perdas no intuito de diminuir a probabilidade de comprometimento no aporte de alfa-tocoferol.

Uma vez que a Sociedade Brasileira de Pediatria recomenda o uso de fórmulas infantis para neonatos que não podem ingerir leite materno¹⁸ e que o alfa-tocoferol é um nutriente de extrema importância, principalmente nos primeiros dias de vida, é relevante verificar se os valores da vitamina, fornecidos pelo colostro, bem como pelas fórmulas infantis, atingem o valor de Ingestão Diária Recomendada (% da DRI), atendendo, assim, ao requerimento nutricional do recém-nascido para Vitamina E.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi de caráter transversal, realizado entre janeiro e dezembro de 2012, no qual o processo de definição da amostra foi baseado em demanda espontânea, em que todas as puérperas que necessitaram de internação após o parto, no período especificado, foram submetidas aos critérios de triagem definidos para este estudo.

Todos os procedimentos do estudo foram conduzidos de acordo com os padrões exigidos pela Declaração de Helsink¹⁹ e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, CAAE-0260.0.051.294-11.

O leite colostro foi coletado de 82 lactantes adultas, entre 18-40 anos, sem patologias associadas (diabetes, hipertensão, neoplasias, doenças do trato gastrointestinal e hepáticas, cardiopatias, infecciosas,

sífilis, HIV positivo) que tiveram partos a termo, ocorrido a mais de 12 horas do momento da coleta, com conceito único, sem má-formação e que não fizeram uso de suplementos vitamínicos durante a gestação.

A partir do primeiro dia pós-parto, durante dois dias consecutivos, foram coletados 2 mL de colostro no período da manhã após jejum noturno. O leite foi obtido por expressão manual de uma única mama, sempre no final da mamada, para tentar evitar flutuações no teor de gordura.

As amostras foram coletadas em tubos de polipropileno protegidos da luz, transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Uma vez no laboratório, o leite foi colocado em banho-maria a 37 °C, homogeneizado, retirada à alíquota de 500 µL e, por fim, colocado em tubo de polipropileno protegido da luz e armazenado a -18 °C até o momento das análises.

Para o leite, foi utilizada metodologia adaptada de Romeu-Nadal et al²⁰, em que, em 500 µL de colostro, foram adicionados igual quantidade de etanol a 95 % (Merck, São Paulo, Brasil). O tubo, contendo a mistura, foi agitado mecanicamente por 1 minuto. O processo extrativo foi realizado em duas etapas com dois mililitros de hexano cada (Merck, São Paulo, Brasil), agitado mecanicamente por mais 1 minuto e centrifugado (10 min, 1073G), resultando em uma extração total de 4 mL da fase hexânica.

Metade do combinado orgânico obtido foi evaporado, utilizando nitrogênio. O extrato seco foi dissolvido em 500 µL de etanol absoluto, grau CLAE (Merck, São Paulo, Brasil), para posterior análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase reversa.

As concentrações de α-TOH foram determinadas por CLAE com cromatógrafo Shimadzu® LC-20AT, equipado com loop injetor de 20 µL, comunicador CBM 20 A e acoplado a um Detector SPD-20A UV-VIS, com detecção UV (λ_{\max} = 292 nm). A separação cromatográfica foi realizada com coluna de fase reversa LC Shim-pack® CLC-ODS(M) 4,6 mm x 25 cm. A eluição foi isocrática, com fase móvel composta de metanol/água ultrapura (Mili-Q) em 97:3(v:v) com fluxo 1,0 mL/min. Os cromatogramas foram integrados, utilizando o programa LC- solution®.

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®.

A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico²¹ em etanol absoluto grau CLAE (Merck, São Paulo, Brasil), ϵ 1 %, 1 cm = 75,8.

Para avaliar a oferta de alfa-tocoferol pelo leite materno, foi adotada uma ingestão diária de 500 mL de colostro e comparada com a Dietary Reference Intake (DRI) para crianças de 0 à 6 meses, equivalente à 4 mg/dia^{5,22}.

Para determinar a precisão e exatidão, foram realizados os testes de recuperação e repetitividade expressa por desvio padrão relativo (DPR), com três concentrações (50 ng/mL, 100 ng/mL e 200 ng/mL), contemplando a faixa de variação dentro da curva de linearidade.

A taxa de recuperação média de alfa-tocoferol no leite colostro foi de 98,8 %. As medições foram caracterizadas por repetibilidade satisfatória, com DPR de soro e leite 7,70 %.

Para determinação do Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ), uma amostra de leite colostro de concentrações conhecidas foi diluída em diversas concentrações. Cada diluição da amostra foi aplicada e o pico observado de forma que o LD foi determinado quando não houve mais distinção entre ruído e o sinal analítico, sendo atingido na concentração de 0,48 µg/mL e o LQ foi determinado quando o sinal analítico foi detectado na menor diluição equivalente a 0,97 µg/mL²³.

A curva de calibração para α-TOH foi linear dentro de 1,2- 41,3 µg/mL ($r^2 = 0,9998$) e realizada com seis soluções de concentrações diferentes, obtidas a partir de uma solução-mãe de padrão de alfa-tocoferol (Sigma®).

Para a comparação do conteúdo de alfa-tocoferol das fórmulas infantis, foram escolhidas, no supermercado, quatro marcas específicas para crianças de 0 a 6 meses, que apresentavam a concentração de alfa-tocoferol no rótulo. As marcas foram denominadas como F1, F2, F3 e F4.

No cálculo da concentração de alfa-tocoferol, foram observadas as instruções fornecidas pelo rótulo para a reconstituição. As orientações de reconstituição das marcas F1, F2, F3 e F4 foram de 13,7 g, 13,3 g, 12,9 g e 13,1 g de pó para 90 mL de água, respectivamente. Baseando-se na concentração desse micronutriente em 100 mL, foi feita a relação direta para 500 mL, mesmo volume utilizado para o cálculo no colostro.

RESULTADOS

A concentração média de alfa-tocoferol encontrada no colostro foi de 1479 ± 808 $\mu\text{g/dL}$, revelando uma oferta de 7,3 mg por dia, enquanto que a concentração média informada no rótulo das fórmulas foi de 810 ± 182 $\mu\text{g/dL}$, evidenciando a oferta de 4,1 mg/dia. Estas concentrações das fórmulas encontram-se elencadas na Tabela 1. Os valores de alfa-tocoferol fornecidos por dia pelo colostro e pelas fórmulas foram calculados a partir do volume de ingestão diária do recém-nascido de 500 mL²².

Ao analisar individualmente as fórmulas, foi evidenciado que a concentração de alfa-tocoferol da marca F3 oferta apenas 68 % da recomendação preconizada para a faixa etária. As demais fórmulas apresentaram, em seu rótulo, valores de alfa-tocoferol acima de 4 mg/dia.

Ao comparar o colostro com as fórmulas infantis, o primeiro fornece concentração média superior em 3,2 mg/dia de alfa-tocoferol (Figura 1) e, ao compararmos com a AI, o colostro provê 82 % mais que o recomendado pelo Institute of Medicine – IOM⁵.

Tabela 1. Concentrações de alfa-tocoferol obtidas a partir do rótulo de quatro marcas de fórmulas infantis recomendadas para crianças de 0 a 6 meses em comparação com o colostro

| Concentrações | | | | | |
|---------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Amostras | F1 | F2 | F3 | F4 | Colostro |
| 100 g de pó | 6,5 mg* | 7,0 mg* | 4,2 mg* | 6,5 mg* | - |
| 500 mL | 4,5 mg** | 4,7 mg** | 2,7 mg** | 4,3 mg** | 7,6 mg*** |

* Valores obtidos no rótulo das respectivas fórmulas infantis; ** Valores obtidos a partir da informação nutricional de alfa-tocoferol em 100 mL de fórmula infantil reconstituída, fazendo a correspondência direta para 500 mL; *** Concentrações obtidas pela determinação de alfa-tocoferol nas amostras de colostro utilizadas no presente estudo.

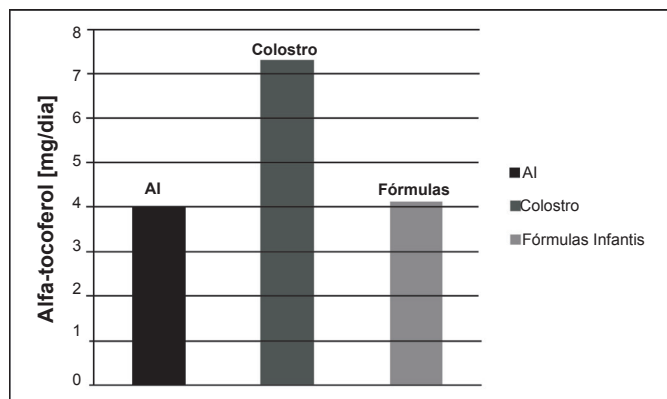


Figura 1. Comparativo entre o conteúdo de alfa-tocoferol ofertado pelo colostro e fórmulas infantis com a Ingestão Adequada (AI)

DISCUSSÃO

A concentração média de alfa-tocoferol no leite colostro foi de 1479 ± 808 $\mu\text{g/dL}$. Tal concentração foi semelhante a estudos realizados na Turquia (1327 ± 69 $\mu\text{g/dL}$)²⁴ e nos Estados Unidos (1335 ± 198 $\mu\text{g/dL}$)²⁵.

Quanto às fórmulas infantis, foi encontrada uma concentração média de 810 ± 182 $\mu\text{g/dL}$. O leite colostro demonstra fornecer, em média, uma quantidade superior de alfa-tocoferol que as fórmulas infantis.

Sziklai-László et al²⁶ realizaram comparações entre o conteúdo de alfa-tocoferol, em fórmulas infantis, com o conteúdo desta vitamina no leite de transição e maduro. Foi verificado que a diluição recomendada no rótulo destas fórmulas diminuía de 6 a 8 vezes o conteúdo de tocoferol presente no pó não-diluído e que o conteúdo desta vitamina fornecido pelas fórmulas foi significativamente menor do que o ofertado pelo leite materno em ambas as fases de lactação.

Ao comparar a provável ingestão de leite diária com a recomendação de vitamina E para menores de 6 meses, pode-se observar que a quantidade consumida pelo recém-nascido atinge as 4 mg/dia de alfa-tocoferol recomendadas, tanto para o leite colostro, quanto para as fórmulas infantis (Figura 1).

Entretanto, ao analisar individualmente os rótulos das fórmulas, foi evidenciado que a concentração de alfa-tocoferol da marca F3 oferta apenas 68 % da recomendação preconizada. As demais fórmulas apresentaram seus valores de alfa-tocoferol acima de 4 mg/dia, todavia, estas apresentam concentrações inferiores quando comparadas ao leite colostro, que fornece 82 % a mais que a AI.

Não se sabe, ao certo, se 4 mg/dia de alfa-tocoferol seriam suficientes nesta fase de lactação, uma vez que para a determinação da DRI de alfa-tocoferol para lactentes de 0 a 6 meses foi analisada apenas a média de ingestão deste nutriente a partir dos dois meses de lactação⁵. Portanto, não leva em consideração o primeiro mês de vida, fase em que o recém-nascido tem um desequilíbrio do sistema antioxidante²⁷, devido à transição para o ambiente extra-uterino, significativamente mais rico em oxigênio^{28,29}.

Segundo Sziklai-László et al²⁶, a fase de lactação é um fator determinante para o conteúdo de alfa-tocoferol no leite. Porém, independente da fase de lactação, autores afirmam que o alfa-tocoferol presente no leite materno é mais biodisponível que a ofertada nas fórmulas infantis^{30,31}.

Além disso, as fórmulas infantis apresentam alto poder de oxidação e estão expostas a fatores como luminosidade, pH e temperaturas adversas, fatores que podem facilitar a isomerização do alfa-tocoferol, conduzindo assim à perda total ou parcial do valor nutricional³², ou seja, sua utilização nos põe em dúvida se o aporte de alfa-tocoferol seria fornecido de forma adequada nos primeiros dias de vida.

Sendo assim, o leite colostro é capaz de fornecer uma quantidade superior de alfa-tocoferol quando comparado às fórmulas infantis. Este maior fornecimento pode garantir o suporte nutricional adequado e promover a formação de reservas da vitamina, além de fortalecer as defesas do recém-nascido³³.

O leite humano é indiscutivelmente o alimento que reúne as características nutricionais ideais, tais como: composição nutricional balanceada, biodisponibilidade de nutrientes, presença de fatores de crescimento, enzimas e hormônios, além de desenvolver inúmeras vantagens imunológicas e psicológicas, importantes na diminuição da morbidade e mortalidade infantil, sendo importante para a mãe, família e sociedade em geral³⁴.

CONCLUSÃO

Ao comparar o colostro com as fórmulas infantis, fica evidenciado que, apesar de a maioria das fórmulas conter em seus rótulos informações que sugerem atingir o requerimento nutricional durante a primeira semana de vida do recém-nascido, o conteúdo de alfa-tocoferol ofertado é menor quando comparado ao do leite colostro. Além disso, nem todas as fórmulas infantis forneceram alfa-tocoferol em quantidade superior ao recomendado para suprir as necessidades e formar reservas de alfa-tocoferol para recém-nascido.

REFERÊNCIAS

1. Traber M. Vitamin E. In: Zempleni J, Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, editores - Handbook of vitamins. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 154-155.
2. Scholl TO, Leskiw M, Chen X, Sims M, Stein TP. Oxidative stress, diet, and the etiology of preeclampsia. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81:1390-6.
3. Debier C. Vitamin E during pre- and postnatal periods. *Vitam Horm*. 2007;76:357-73.
4. Lira LQ, Ribeiro PR, Grilo EC, Lima MS, Dimenstein R. Níveis de alfa-tocoferol no soro e colostro de lactantes e associação com variáveis maternas. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012;34: 362-8.
5. Institute of Medicine, Food Nutrition Board. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids: a report of the Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference. Washington (DC): National Academy Press 2000 [acesso 2012 Dez 6]. Disponível em: [http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309069351].
6. Souza SND, Migoto MT, Rossetto EG, Mello DF. Prevalência de aleitamento materno e fatores associados no município de Londrina-PR. *Acta Paul Enferm*. 2012;25:29-35.
7. World Health Organization - WHO. The optimal duration of exclusive breastfeeding. Note for the press. 2001; 7.
8. Réa MF. Reflexões sobre amamentação no Brasil: de como passamos a 10 meses de duração. *Cad Saúde Publica*. 2003;19:37-45.
9. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas, Secretaria de Atenção à Saúde, Ministério da Saúde. II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal. Brasília, 2009. [acesso 2013 Abr 14]. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_prevalencia_aleitamento_materno.pdf].
10. Brunken GS, Silva SM, França GVA, Escuder MML, Venancio SI. Fatores associados à interrupção precoce do aleitamento materno exclusivo e à introdução tardia da alimentação complementar no Centro-oeste brasileiro. *J Pediatr*. 2006; 82: 445-51.
11. Alves CR, Goulart EM, Colosimo EA, Goulart LM. Fatores de risco para o desmame entre usuárias de uma unidade básica de saúde de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, entre 1980 e 2004. *Cad Saúde Publica*. 2008;24:1355-67.
12. Bernardi JL, Jordão RE, Barros F. Alimentação complementar de lactentes em uma cidade desenvolvida no contexto de um país em desenvolvimento. *Rev Panam Salud Publica*. 2009; 26: 405-11.
13. Victora CG, Smith PH, Vaughan JP, Nobre LC, Lombardi C, Teixeira AM, et al. Evidence for protection by breastfeeding against infant deaths from infectious diseases in Brazil. *Lancet*. 1987;2:319-22.
14. McNeil ME, Labbok MH, Abrahams SW. What are the risks associated with formula feeding? A reanalysis and review. *Birth*. 2010; 37:50-8.
15. Giugliani ER, Victora CG. Complementary feeding. *J Pediatr*. 2000;76:253-62.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 43, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 21 set. 2011. Cap 1, seção 3, nº 1, p. 2-3.
17. Abranches MV, Della Lucia CM, Sartori MA, Pinheiro Sant'Ana HM. Perdas de vitaminas em leite e produtos lácteos e possíveis medidas de controle. *Alim Nutr*. 2008;19(2):207-17.
18. Sociedade Brasileira de Pediatria - Departamento de Nutrologia. Manual de orientação: alimentação do lactente, alimentação do pré-escolar, alimentação do escolar, alimentação do adolescente, alimentação na escola. São Paulo: SBP 2006 [acesso 2012 Nov 20]. Disponível em: [www.sbp.com.br/img/manuais/manual_alim_dc_nutrologia.pdf].
19. World Medical Association - WMA. Declaration of Helsinki. Edinburgh, Scotland: 52nd General Assembly-WMA, 2000.
20. Romeu-Nadal M, Morera-Pons S, Castellote AI, Lopez-Sabater

- MC. Determination of γ and α -tocopherols in human milk by a direct high-performance liquid chromatographic method with UV-vis detection and comparison with evaporative light scattering detection. *J Chromat A*. 2006;1114: 132-7.
21. Nierenberg DW, Nann, SL. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr*. 1992;56: 417-26.
 22. Ross JS, Harvey PW. Contribution of breastfeeding to Vitamin A nutrition of infants: a simulation model. *Bull WHO*. 2003; 81: 80-6.
 23. Ribani M, Botolli CB, Jardim IC, Melo LF. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004; 27:771-80.
 24. Orhon FS, Ulukol B, Kahya D, Cengiz B, Baskan S, Tezcan S. The influence of maternal smoking on maternal and newborn oxidant and antioxidant status. *Eur J Pediatr*. 2009;168:975-81.
 25. Gossage J, Deyhim M, Yamini S, Douglass LW, Phylis E, Moser-Veillon B. Carotenoid composition of human milk during the first month postpartum and the response to β -carotene supplementation. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:193-7.
 26. Sziklai-László I, Majchrzak D, Elmadfa I, Cser M. Selenium and vitamin E concentrations in human milk and formula milk from Hungary. *J Radioanal Nucl Chem*. 2009;279:585-90.
 27. Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189:181-8.
 28. Robles R, Palomino N, Robles A. Oxidative stress in the neonate. *Early Hum Dev*. 2001;65:75-81.
 29. Gomes MM, Saunders C, Accioly E. Vitamin A role preventing oxidative stress in newborns. *Rev Bras Saude Matern Infant*. 2005;5:275-82.
 30. Ostrea EM, Balun JE, Winkler T. Influence of breast-feeding on the restoration of the low serum concentration of vitamin E and beta-carotene in the newborn infant. *Am J Obstet Gynecol*. 1986;154:1014-7.
 31. Bendich A, Brock PE. Rationale for the introduction of long chain polyunsaturated fatty acids and for concomitant increase in the level of vitamin E in infant formulas. *Intern J Vitam Nutr Res*. 1997;67:213-31.
 32. Paixão JA, Stamford TL. Vitaminas lipossolúveis em alimentos: uma abordagem analítica. *Quím Nova*. 2004;27(1):96-105
 33. 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*. 2001; 45:82-5.
 34. 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.