



ARTIGO ORIGINAL

Effect of maternal vitamin A supplementation on retinol concentration in colostrum^{☆,☆☆}



Evellyn C. Grilo^{a,*}, Mayara S.R. Lima^a, Lahyana R.F. Cunha^b,
Cristiane S.S. Gurgel^a, Heleni A. Clemente^a e Roberto Dimenstein^a

^a Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brasil

^b Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campina Grande, PB, Brasil

Recebido em 7 de fevereiro de 2014; aceito em 14 de maio de 2014

KEYWORDS

Colostrum;
Fasting;
Postprandial period;
Supplementary
feeding;
Vitamin A

Abstract

Objective: To investigate the effect of vitamin A supplementation on the retinol concentration in colostrum under fasting and postprandial conditions.

Methods: This was a quasi-experimental study, with before and after assessments, conducted with 33 patients treated at a public maternity hospital. Blood and colostrum samples were collected under fasting conditions in the immediate postpartum period. A second colostrum collection occurred two hours after the first meal of the day, at which time a mega dose of 200,000 IU of retinyl palmitate was administered. On the following day, the colostrum was collected again under fasting and postprandial conditions. Serum and colostrum retinol concentrations were determined by high performance liquid chromatography.

Results: The serum retinol concentration was 37.3 (16.8-62.2) $\mu\text{g/dL}$, indicating adequate nutritional status. The colostrum retinol concentration before supplementation was 46.8 (29.7-158.9) $\mu\text{g/dL}$ in fasting and 67.3 (31.1-148.7) $\mu\text{g/dL}$ in postprandial condition ($p < 0.05$), showing an increase of 43.8%. After supplementation, the values were 89.5 (32.9-264.2) $\mu\text{g/dL}$ and 102.7 (37.3-378.3) $\mu\text{g/dL}$ in fasting and postprandial conditions, respectively ($p < 0.05$), representing an increase of 14.7%.

Conclusions: This study demonstrated that maternal supplementation with high doses of vitamin A in postpartum resulted in a significant increase of the retinol concentration in colostrum under fasting conditions, with an even greater increase after a meal.

© 2014 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2014.05.004>

☆ Como citar este artigo: Grilo EC, Lima MS, Cunha LR, Gurgel CS, Clemente HA, Dimenstein R. Effect of maternal vitamin A supplementation on retinol concentration in colostrum. J Pediatr (Rio J). 2015;91:81–6.

☆☆ Estudo conduzido na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mails: evellyn-cg@hotmail.com (E.C. Grilo), mayara.lima@yahoo.com.br (M.S.R. Lima).

PALAVRAS-CHAVE

Colostro;
Jejum;
Período pós-prandial;
Suplementação
alimentar;
Vitamina A

Efeito da suplementação materna com vitamina A sobre a concentração de retinol no colostro**Resumo**

Objetivo: Investigar o efeito da suplementação com vitamina A sobre a concentração de retinol no leite colostro em condições de jejum e pós-prandial.

Métodos: Estudo quase-experimental, do tipo antes e depois, realizado com 33 parturientes atendidas em uma maternidade pública, das quais foram coletadas, em jejum, amostras de sangue e leite colostro, no pós-parto imediato. Uma segunda coleta de colostro ocorreu duas horas após a primeira refeição do dia, momento em que uma megadose de 200.000 UI de palmitato de retinila foi administrada. No dia seguinte, uma nova coleta de colostro foi realizada em condições de jejum e pós-prandial. As concentrações de retinol no soro e no colostro foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Resultados: A concentração de retinol sérico foi de 37,3 (16,8-62,2) µg/dL, evidenciando um estado nutricional adequado. No colostro, a concentração de retinol antes da suplementação foi de 46,8 (29,7-158,9) µg/dL em jejum e 67,3 (31,1-148,7) µg/dL em condições pós-prandiais ($p < 0,05$), mostrando um aumento de 43,8%. Após a suplementação, os valores foram de 89,5 (32,9-264,2) µg/dL e 102,7 (37,3-378,3) µg/dL em jejum e pós-prandial, respectivamente ($p < 0,05$), representando um aumento de 14,7%.

Conclusões: Este trabalho demonstrou que a suplementação materna com altas doses de vitamina A no pós-parto resultou em um aumento significativo da concentração de retinol no colostro em condições de jejum, sendo este valor ainda maior após a refeição.

© 2014 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Introdução

A vitamina A é essencial para o crescimento e desenvolvimento humanos, atua na preservação da visão e contribui para o funcionamento adequado do sistema imunológico, defendendo o organismo contra infecções.¹

A deficiência de vitamina A (DVA) pode levar a desordens como xeroftalmia e cegueira noturna na infância, além de anemia e baixa resistência a infecções, o que pode aumentar a severidade de doenças infecciosas e o risco de morte. Crianças em idade pré-escolar e mulheres grávidas são consideradas as populações com maior risco para a DVA, sendo estimado que aproximadamente um terço da população mundial de pré-escolares e 15% das mulheres grávidas são bioquimicamente deficientes, principalmente na África e sudeste da Ásia.²

Estudos indicam que a deficiência de vitamina A configura-se como um problema de saúde pública nas regiões Norte, Nordeste e em algumas partes do Sudeste do Brasil.³ Em 2006, a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS) indicou que a prevalência de DVA no Brasil é de 17,4% em crianças menores de cinco anos e 12,3% em mulheres não grávidas em idade reprodutiva.⁴

As gestantes e lactantes apresentam um maior requerimento de vitamina A e o risco de deficiência é agravado pelo baixo consumo do nutriente e pela emergência de infecções nesses grupos.^{1,5} A Organização Mundial de Saúde (OMS), o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e o Grupo Consultivo Internacional sobre Vitamina A (IVACG) recomendam o fornecimento de doses elevadas (200.000 UI) de vitamina A até o 60º dia pós-parto às

puérperas de regiões onde a deficiência desse nutriente é endêmica.⁶

O leite materno é fonte de energia e nutrientes em quantidades adequadas para a nutrição do lactente, possuindo proteínas, lipídios, glicídios e sais minerais, além de vitaminas, linfócitos, imunoglobulinas e fatores de crescimento.⁷ O colostro é a secreção láctea dos primeiros dias pós-parto, e diversos estudos demonstram o efeito protetor da alimentação do recém-nascido com esse leite, principalmente se ofertado na primeira hora de vida, atuando no combate à mortalidade neonatal.⁸

De acordo com Black et al.,⁹ o risco de um recém-nascido ter suas reservas esgotadas é maior quando há deficiência materna de micronutrientes. Sendo assim, o conteúdo de vitamina A no leite materno é o principal determinante do estado nutricional dessa mesma vitamina no recém-nascido.

Ross et al.¹⁰ afirmam que o retinol é transferido para o leite de duas formas: através da proteína ligadora de retinol (RBP) e dos quilomícrons. No entanto, o mecanismo de transferência de vitamina A para o leite ainda não é totalmente compreendido em seres humanos e tem sido objeto de estudo em modelos animais.¹¹

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação materna com vitamina A sobre a concentração de retinol no colostro humano em condições de jejum e pós-prandial, a fim de contribuir para a compreensão dos mecanismos de transferência do retinol para a glândula mamária em humanos, visto que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura foi realizada em animais.

Métodos

Tratou-se de um estudo de intervenção quase-experimental, do tipo antes e depois, no qual a amostragem foi por conveniência. Participaram do estudo 33 puérperas voluntárias de 18 a 35 anos atendidas pelo serviço de obstetria de uma maternidade pública. O tamanho da amostra foi calculado assumindo um erro alfa igual a 5%, poder do estudo de 80% e o tamanho do efeito igual a 0,60. A partir do referido cálculo, estimou-se um tamanho amostral mínimo de 33 participantes.¹²

Não foram consideradas elegíveis para participação aquelas mulheres com comorbidades identificadas (diabetes *mellitus*, neoplasias, doenças hepáticas e do trato gastrointestinal, cardiopatias, sífilis e HIV positivo), adolescentes que tiveram parto pré-termo, com conceitos múltiplos ou com má formação, bem como aquelas que relataram ter feito uso de suplementos contendo vitamina A durante o período gestacional ou pós-parto imediato. As participantes que estavam em conformidade com os critérios de seleção foram incluídas no estudo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário.

Coleta de dados e material biológico

As amostras de sangue (5 mL) e de leite colostro (2 mL) foram coletadas das puérperas em jejum, antes da primeira refeição do dia. O sangue foi obtido por punção venosa realizada por um profissional de enfermagem da maternidade. O leite foi coletado por alunas de graduação treinadas, por expressão manual de uma única mama, no início e no final da mamada. Uma segunda coleta de colostro ocorreu duas horas após a primeira refeição do dia (condição pós-prandial). Em seguida, uma cápsula de 200.000 UI (60 mg) de palmitato de retinila foi administrada. No dia seguinte, foi realizada nova coleta de leite nas condições de jejum e pós-prandial. As amostras foram coletadas em tubos de polipropileno protegidos da luz e mantidas sob refrigeração durante o transporte para o laboratório de bioquímica dos alimentos e da nutrição. As amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos (500xg) para separação e retirada do soro, que foi armazenado a -20°C , juntamente com as alíquotas de 500 μL de leite colostro, até o momento das análises.

Dados maternos e obstétricos foram coletados do prontuário de cada parturiente.

Quantificação de retinol no soro e leite maternos

O retinol foi extraído das amostras de leite colostro de acordo com o método de Giuliano et al. adaptado.¹³ A extração de retinol do soro foi feita segundo o método de Ortega et al.¹⁴

Os extratos secos obtidos das amostras de leite e soro foram dissolvidos em etanol absoluto e 20 μL foram aplicados no aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fase móvel utilizada foi metanol a 100% em sistema isocrático e com fluxo de 1,0 mL/min. O comprimento de onda utilizado foi 325 nm.

A identificação e a quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação da área do pico obtido no cromatograma com a área do padrão de retinol (Sigma®, MO, Estados Unidos). A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico para retinol ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 1.780$ a 325 nm) em etanol absoluto.¹⁵

A exatidão do método foi avaliada por meio do teste de recuperação da extração. As médias de recuperação obtidas para o retinol acetato das amostras de leite e soro foram de 96% e 95%, indicando eficácia na extração. Intervalos aceitáveis de recuperação geralmente estão entre 80 e 110%.¹⁶

A linearidade da curva foi determinada avaliando-se a proporcionalidade entre a resposta do detector e diferentes concentrações do padrão de retinol. A curva de calibração foi obtida por regressão linear (área do pico em função da concentração do padrão) e o coeficiente de correlação obtido foi de 0,990, permitindo a quantificação de retinol pelo método do padrão externo.

Análise estatística

Os valores de retinol foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliar o acoplamento à distribuição normal. Os dados deste estudo são de amostras pareadas e não apresentaram distribuição normal, por isso foi utilizado o teste não paramétrico para amostras pareadas de Wilcoxon. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Para avaliar a relação entre a concentração de retinol no soro e no leite colostro foi utilizado o teste de correlação de Spearman. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos softwares Minitab 15 Statistical (Minitab, State College PA, Estados Unidos) e R Development Core Team (Lucent Technologies, NJ, Estados Unidos).

Resultados

A concentração mediana de retinol no soro das 33 mulheres foi 37,3 (16,8-62,2) $\mu\text{g}/\text{dL}$, considerada adequada de acordo com os valores de referência ($> 20 \mu\text{g}/\text{dL}$).¹⁷ No colostro, a concentração mediana da vitamina antes da suplementação foi 46,8 (29,7-158,9) $\mu\text{g}/\text{dL}$ em jejum e 67,3 (31,1-148,7) $\mu\text{g}/\text{dL}$ em condições pós-prandiais ($p < 0,05$), mostrando um aumento de 43,8% depois da refeição. Após a suplementação, os valores foram de 89,5 (32,9-264,2) $\mu\text{g}/\text{dL}$ e 102,7 (37,3-378,3) $\mu\text{g}/\text{dL}$ em condições de jejum e pós-prandial, respectivamente ($p < 0,05$), equivalendo a um aumento de 14,7% (tabela 1). Além disso, a comparação do retinol do colostro de jejum antes da suplementação com o retinol pós-prandial após a suplementação evidenciou um aumento de 219,4%.

A concentração de retinol no colostro das parturientes em jejum antes da suplementação não apresentou correlação com os valores de retinol sérico das mesmas. As correlações entre os níveis de retinol das amostras de colostro, coletadas em diferentes momentos, são apresentadas na tabela 2.

Tabela 1 Concentração de retinol no leite colostro e no soro de parturientes de uma maternidade pública

	Mediana	IIQ ₂₅₋₇₅	LI	LS
Leite (AS, jejum)	46,8	33,9 - 102,9	29,7	158,9
Leite (AS, pós-prandial)	67,3	44,1 - 105,5	31,1	148,7
Leite (DS, jejum)	89,5	63,1 - 137,7	32,9	264,2
Leite (DS, pós-prandial)	102,7	76,6 - 150,5	37,3	378,3
Soro materno (AS, jejum)	37,3	31,2 - 50,3	16,8	62,2

IIQ₂₅₋₇₅, intervalo entre quartis; LI, limite inferior; LS, limite superior; AS, antes da suplementação; DS, depois da suplementação.

Discussão

Até o final da gravidez, uma dieta equilibrada é importante para garantir a transferência de nutrientes para o feto, a fim de prepará-lo para o nascimento e período de lactação. A vitamina A desempenha um papel importante durante estes períodos, uma vez que está envolvida em processos de crescimento e proliferação celular, tais como os que ocorrem durante a gravidez, lactação e primeira infância.⁵

A suplementação materna com vitamina A no pós-parto imediato tem sido uma intervenção amplamente utilizada em áreas de alto risco para a deficiência desta vitamina, e estudos indicam que esta intervenção resulta em um aumento no retinol do leite materno.^{18,19}

Os valores de retinol sérico observados nas mulheres deste estudo (37,3 µg/dL) foram inferiores àqueles encontrados na Alemanha (49,3 µg/dL)²⁰ e Sudeste brasileiro (48,1 µg/dL),²¹ e semelhantes aos verificados em mulheres do Nordeste do Brasil (40,1 µg/dL).²²

No leite colostro, os níveis de retinol em condições de jejum antes da suplementação foram inferiores aos de mulheres do Nordeste brasileiro (100,3 µg/dL)²² e de Bangladesh.²³ Essas diferenças podem ter ocorrido devido ao maior número amostral nos estudos mencionados e ao fato de a concentração de retinol no leite ter sido expressa como média e desvio-padrão, por apresentar aderência à distribuição normal. Além disso, o estudo realizado em Bangladesh não informou se as coletas do leite colostro foram realizadas em condições de jejum ou pós-prandial.

Neste estudo, quando comparados os níveis de retinol do leite em condições de jejum e pós-prandial, foi observado um aumento significativo após a refeição, nos dois dias de coleta. Na análise estatística, os valores de *r* indicaram correlação forte (*r* = 0,65) entre essas concentrações, tanto antes quanto após a suplementação (tabela 2).

Estudos realizados em animais demonstraram que a vitamina A é transferida para o leite materno a partir de duas fontes: RBP (proteína transportadora de retinol) e ésteres de retinila transportados por lipoproteínas (quilomícrons).²⁴

No jejum, praticamente todo retinol circulante está associado à proteína transportadora de retinol e os níveis dessa proteína não variam com a ingestão de grandes quantidades de vitamina A. No entanto, os ésteres de retinila transportados por quilomícrons variam de acordo com o teor de vitamina A da dieta, existindo a contribuição dessas lipoproteínas para o transporte de retinol até a glândula mamária.^{10,11,25-27}

Neste estudo, o aumento do retinol no colostro após a refeição sugere que, em humanos, além do mecanismo de transporte de retinol para a glândula mamária via RBP, há uma forma adicional de transferência deste nutriente. Uma vez que este aumento foi verificado em condições pós-prandiais, acredita-se que este mecanismo adicional seja via quilomícrons, tal como foi comprovado em animais. Sendo assim, sugere-se que a suplementação de vitamina A seja administrada próximo ao horário de uma refeição para participação ativa dos quilomícrons e consequente melhor aproveitamento da vitamina ofertada.

Segundo Blaner et al.,²⁷ cerca de 60% da vitamina A são transferidos para a glândula mamária através dos quilomícrons e dependem dos sítios de ligação da lipoproteína lipase (LPL) e da hidrólise de ésteres de retinila dos quilomícrons pela ação desta enzima, cuja atividade aumenta durante a lactação. Uma maior porcentagem de vitamina A ingerida é direcionada preferencialmente para a glândula mamária em lactantes, em contraste com o que ocorre na ausência de estados de lactação.^{10,25,26} É provável também que o resultado de uma maior transferência de vitamina A para a glândula mamária ocorra provavelmente devido a um aumento de receptores mamários de RBP-retinol para a formação de colostro.²⁸ Essas evidências corroboram os

Tabela 2 Correlação entre concentrações de retinol no leite de parturientes em condições de jejum e pós-prandial, antes e depois da suplementação de vitamina A

Correlação (<i>r</i>) ^a	AS, jejum	AS, pós-prandial	DS, jejum	DS, pós-prandial
AS, jejum	1,00	0,65	0,50	0,28
AS, pós-prandial	0,65	1,00	0,32	0,26
DS, jejum	0,50	0,32	1,00	0,65
DS, pós-prandial	0,28 ^a	0,26	0,65	1,00

Correlação de Spearman.

AS, antes da suplementação; DS, depois da suplementação.

^a 0,10 < *r* < 0,29 (baixa), 0,30 < *r* < 0,49 (moderada), 0,50 < *r* < 1,00 (forte), de acordo com Cohen.³¹

resultados obtidos em nosso estudo, dado que mostrou um aumento na quantidade de retinol após uma refeição e suplementação.

A vitamina A liberada durante a hidrólise dos ésteres de retinila pode ser reesterificada para a secreção no leite materno ou armazenada nas células epiteliais, o que explica a manutenção de níveis de vitamina A elevados no leite materno horas após a suplementação, como foi verificado neste estudo. Isso ocorre com a participação da enzima que esterifica retinol e está presente no tecido mamário, denominada ARAT (acil-coenzima A: aciltransferase de retinol).^{25,26,29,30} Além disso, as reservas hepáticas de vitamina A também se encontram aumentadas após a suplementação e contribuem para os maiores níveis de retinol no leite materno.

Assim, sugere-se que a suplementação de vitamina A realizada no pós-parto aumenta a porcentagem de retinol no colostro, que em condição pós-prandial ocorre através da contribuição de ésteres de retinila de quilomícrons produzidos em decorrência da refeição, cooperando com a vitamina A armazenada na glândula mamária e no fígado, sendo transportada deste último da RBP até o tecido mamário.

Como exposto na [tabela 2](#),³¹ a análise estatística mostrou uma correlação forte entre os valores de retinol no colostro das mulheres antes e após a refeição no primeiro dia, isto é, antes da suplementação materna com vitamina A. Entretanto, os níveis de retinol na condição pós-prandial do dia seguinte à administração do suplemento mostraram uma correlação fraca com os valores de retinol de jejum do primeiro dia.

Uma explicação para a fraca correlação supracitada é que parece haver um limite de aumento da concentração desse micronutriente no leite materno, o que pode ocorrer devido à saturação das proteínas envolvidas nas vias de transferência de retinol do sangue para a glândula mamária (lipoproteínas e RBP), bem como das enzimas envolvidas na reesterificação e secreção de vitamina A no colostro. Tal situação evitaria um aumento excessivo de retinol no leite, indicando a existência de um mecanismo adaptativo que evitaria a passagem de quantidades excessivas de retinol para o leite materno, protegendo o recém-nascido contra a toxicidade desse micronutriente.

Sabe-se que a concentração de retinol no soro humano é altamente controlada pelos mecanismos de homeostase hepáticos. Por outro lado, foi observado neste estudo que o estado bioquímico de retinol no leite materno pode sofrer modificações de acordo com mudanças dietéticas. Assim, para efeitos de diagnóstico do estado nutricional em vitamina A, é necessário que a coleta do leite seja realizada em jejum.

Neste estudo, foi observado que há um aumento da concentração de retinol no colostro humano em condições pós-prandiais e após a suplementação materna com palmitato de retinol. Isso indica que o mecanismo de transporte de retinol para a glândula mamária via quilomícrons, já conhecido em animais, provavelmente também ocorra em humanos. Além disso, foi possível verificar a eficácia da suplementação materna, indicando que a oferta de altas doses de vitamina A em mulheres no pós-parto imediato e, em especial, junto com a refeição, é uma estratégia eficaz para melhorar o estado nutricional em retinol de puérperas e seus lactentes.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Ross A. Introduction to vitamin A: a nutritional and life cycle perspective. In: Packer L, Obermueller-Jevic U, Kraemer K, Sies H, editors. Carotenoids and retinoids: molecular aspects and health issues. California: AOCs Press; 2005.
- World Health Organization. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005: WHO global database on vitamin A deficiency. Geneva: World Health Organization; 2009.
- Queiroz D, Paiva AA, Pedraza DF, Cunha MA, Esteves GH, Luna JG, et al. Deficiência de vitamina A e fatores associados em crianças de áreas urbanas. *Rev Saude Publica*. 2013;47:248-56.
- Brasil. Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher – PNDS 2006: dimensões do processo reprodutivo e da saúde da criança. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
- Picciano MF. Pregnancy and lactation: physiological adjustments, nutritional requirements and the role of dietary supplements. *J Nutr*. 2003;133:1997S-2002S.
- World Health Organization. Collaborative Center for Diet and Nutrition in the Northeast I. Vitamin "A" during pregnancy and lactation. Recommendations and report from a consultation. Recife; 2001.
- Azais-Braesco V, Pascal G. Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:1325S-33S.
- Boccolini CS, Carvalho ML, Oliveira MI, Pérez-Escamilla R. Breastfeeding during the first hour of life and neonatal mortality. *J Pediatr (Rio J)*. 2013;89:131-6.
- Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, Onis M, Ezzati M, et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *The Lancet*. 2008;371:243-60.
- Ross AC, Pasatiempo AM, Green MH. Chylomicron margination, lipolysis, and vitamin A uptake in the lactating rat mammary gland: implications for milk retinoid content. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229:46-55.
- O'Byrne SM, Kako Y, Deckelbaum RJ, Hansen IH, Palczewski K, Goldberg IJ, et al. Multiple pathways ensure retinoid delivery to milk: studies in genetically modified mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298:E862-70.
- 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.
- Giuliano AR, Neilson EM, Kelly BE, Canfield LM. Simultaneous quantitation and separation of carotenoids and retinol in human milk by high-performance liquid chromatography. *Meth Enzymol*. 1992;213:391-9.
- 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.
- 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.
- Pinto GM, Jardim IC. Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method. *J Chromatogr A*. 2000;869:463-9.
- WHO. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application for monitoring and evaluating interventions programmes: micronutrient series. Geneva: World Health Organization/United Nations Children's Fund; 1996.

18. Rice AL, Stoltzfus RJ, 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.
19. Dimenstein R, Lourenço RM, Ribeiro KD. Impact on colostrum retinol levels of immediate postpartum supplementation with retinyl palmitate. *Rev Panam Salud Publica.* 2007;22:51–4.
20. Schulz C, Engel U, Kreienberg R, Biesalski HK, Vitamin A. and beta-carotene supply of women with gemini or short birth intervals: a pilot study. *Eur J Nutr.* 2007;46:12–20.
21. 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.
22. Ribeiro KD, Araujo KF, Souza HH, Soares FB, Pereira MC, Dimenstein R. Nutritional vitamin A status in northeast Brazilian lactating mothers. *J Hum Nutr Diet.* 2010;23:154–61.
23. Bezerra DS, de Araujo KF, Azevedo GMM, Dimenstein R. A randomized trial evaluating the effect of 2 regimens of maternal vitamin a supplementation on breast milk retinol levels. *J Hum Lact.* 2010;26:148–56.
24. 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.
25. Green MH, Green JB, Akohoue SA, Kelley SK, Vitamin A. intake affects the contribution of chylomicrons vs. retinol-binding protein to milk vitamin A in lactating rats. *J Nutr.* 2001;131:1279–82.
26. Green MH, Snyder RW, Akohoue SA, Green JB. Increased rat mammary tissue vitamin A associated with increased vitamin A intake during lactation is maintained after lactation. *J Nutr.* 2001;131:1544–7.
27. Blaner WS, Obunike JC, Kurlandsky SB, Al-Haideri M, Piantedosi R, Deckelbaum RJ, et al. Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *J Biol Chem.* 1994;269:16559–65.
28. Debier C, Larondelle Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br J Nut.* 2005;93:153–74.
29. Akohoue SA, Green JB, Green MH. Dietary vitamin A has both chronic and acute effects on vitamin A indices in lactating rats and their offspring. *J Nutr.* 2006;136:128–32.
30. O'Byrne SM, Palczewski K, Blaner WS. Incorporation of vitamin A into milk of wild type and mutant mice. *Faseb J.* 2006;131:A996–7.
31. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences.* 2nd ed. Hillsdale, NJ: L. Erlbaum Associates; 1988.