Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Fortificação da alimentação complementar com múltiplos
micronutrientes em pó na prevenção da anemia e no
estado nutricional de vitamina A em crianças da Atenção
Básica à Saúde**

Lara Livia Santos da Silva

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutora em Ciências.**

Área de Concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Marly Augusto Cardoso

São Paulo

2017

**Fortificação da alimentação complementar com múltiplos
micronutrientes em pó na prevenção da anemia e no
estado nutricional de vitamina A em crianças da Atenção
Básica à Saúde**

Lara Livia Santos da Silva

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutora em Ciências.**

Área de Concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Marly Augusto Cardoso

Versão corrigida

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dedico,

A Deus, por seu amor e por suas incomparáveis promessas na minha vida; ao meu marido Daniel, pelo apoio incondicional ao longo deste período; e ao meu filho Joshua, que veio de surpresa e inundou minha vida de amor, alegria e cor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por dirigir meus passos em cada momento. Agradeço pelas oportunidades concedidas, pelo renovo e coragem todas as manhãs e por cumprir todas as suas promessas. Tudo vem Dele, por meio Dele e é para a glória Dele.

À minha querida Profa. Dra. Marly Augusto Cardoso, pela oportunidade, orientação, confiança e apoio em todos os momentos. Obrigada por ter compartilhado comigo seu saber, seu tempo e sua história. Você me inspira a ser uma pessoa, esposa, mãe e profissional cada dia melhor.

Ao meu marido Daniel, meu companheiro de todas as horas. Obrigada por permanecer sempre ao meu lado, me transmitindo confiança, me encorajando e me ajudando a prosseguir nesta difícil, porém gratificante, jornada. Obrigada pela compreensão e apoio incondicional, obrigada por cuidar tão bem do nosso Joshinha enquanto eu estava ausente finalizando a tese. Te amo, te admiro e te agradeço por tudo que você faz por mim e por nossa família.

À minha família que, mesmo de longe, vivenciaram comigo todas as alegrias e angústias deste processo. Em especial aos meus pais, Juarez e Silvânia, e seus cônjuges, que sempre primaram pela minha formação pessoal e profissional. Obrigada por cada palavra de incentivo, pelas orações e por sempre acreditarem no meu potencial. Aos meus sogrinhos, Cilenio e Adenícia, pelo incentivo, auxílio e orações, e à minha cunha Marina, por alegrar nossas terças-feiras e pelo apoio sempre que necessário.

À toda equipe do Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar (ENFAC), pelo privilégio de trabalhar com os dados oriundos deste estudo durante meu mestrado e doutorado. Fazer parte desta equipe foi fundamental para meu crescimento científico e intelectual.

Aos pais e crianças participantes do ENFAC, pela contribuição a este estudo. Agradeço pela atenção, disponibilidade e receptividade. Sem a participação de vocês, esta tese não existiria.

Ao Prof. Dr. Wafaie Wahib Fawzi pela orientação durante meu estágio sanduíche na *Harvard T.H. Chan School of Public Health*. Muito obrigada pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

Aos queridos amigos que fiz durante o doutorado, agradeço pela amizade, carinho, e por fazerem deste período algo mais leve e divertido. Em especial, agradeço a querida Bárbara H. Lourenço, por sua generosidade e amizade; a Rosângela A. Augusto, por sua disponibilidade em ajudar sempre com tanto carinho; a Fernanda Cobayashi, Cristieli S.M. Oliveira e Paulo A.R. Neves, pela companhia tão agradável e divertida; a Luciana Y. Tomita, por seu exemplo de competência e serenidade; e a professora Fernanda B. Scagliusi, que me ensinou tanto durante meu estágio PAE e se tornou tão querida pra mim. Eu os guardo carinhosamente em meu coração.

Às professoras Patricia J. Jaime, Alicia M. Manitto, Roseli O.S. Sarni e Fabíola I.S. Souza, membros titulares da banca examinadora da defesa do meu doutorado, que dedicaram um tempo na sua agenda para avaliar e contribuir com este trabalho e, conseqüentemente, com a minha formação.

À Faculdade de Saúde Pública e seus docentes pela oportunidade da realização do doutorado de forma gratuita e com qualidade inigualável.

À CAPES pelo apoio financeiro por meio da bolsa de estudos do doutorado e ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

A todos que, de forma direta ou indireta, vivenciaram comigo os mais diversos sentimentos no decorrer desta trajetória.

RESUMO

Silva LLS. Fortificação da alimentação complementar com múltiplos micronutrientes em pó na prevenção da anemia e no estado nutricional de vitamina A em crianças da Atenção Básica à Saúde [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução - A anemia e a deficiência de vitamina A (DVA) estão entre os principais problemas de saúde pública no mundo. No Brasil, 20,9% das crianças menores de cinco anos apresentam anemia e 17,4% DVA. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde recomendou o uso de múltiplos micronutrientes em pó (MNP) para assegurar o aporte adequado de vitaminas e minerais da alimentação complementar. Embora essa estratégia seja considerada eficaz na prevenção da anemia ferropriva, é ainda controverso seu impacto no estado nutricional de vitamina A. **Objetivo** - Os objetivos desta tese foram: avaliar o impacto da fortificação da alimentação complementar com MNP no estado nutricional de vitamina A (artigo 1), investigar fatores associados à anemia (artigo 2) e descrever o estado nutricional de folato e vitamina B12 e o efeito dessas vitaminas no risco para anemia (artigo 3) em crianças atendidas em Unidades Básicas de Saúde (UBS). **Métodos** - Trata-se de um estudo de intervenção multicêntrico, do tipo ensaio pragmático, realizado em 24 UBS de quatro cidades brasileiras (Goiânia, Olinda, Porto Alegre e Rio Branco) – Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar (ENFAC). A coleta de dados ocorreu entre junho de 2012 e junho de 2013. No início do estudo, o grupo controle (GC) foi constituído por crianças de 10 a 14 meses de idade (n=521) atendidas na rotina vigente de puericultura e, paralelamente, o grupo intervenção (GI) foi constituído por crianças entre seis e oito meses de idade (n=462) que passaram a receber a intervenção com MNP uma vez ao dia por um período de dois a três meses. No artigo 1, modelos de regressão de Poisson multinível foram utilizados para analisar o impacto da fortificação no estado nutricional de vitamina A, comparando-se as crianças do GI, após quatro a seis meses de acompanhamento, com as crianças do GC. Nos artigos 2 e 3, modelos de regressão de Poisson multinível foram utilizados para investigar fatores associados ao risco para anemia (concentração de hemoglobina sanguínea <110 g/L) e o efeito combinado do estado nutricional de vitamina B12 e folato em relação ao risco de anemia. **Resultados** - No artigo 1, a prevalência da DVA (retinol sérico <0,7 µmol/L) nas crianças do GC foi de 16,2% enquanto no GI foi de 7,5%, representando uma redução de 55% na prevalência de DVA no GI quando comparado ao GC.

Esta redução foi também significativa na vigência ou ausência do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A. A média ajustada das concentrações de vitamina A melhorou no GI, quando comparado ao GC, com um desvio à direita na distribuição da vitamina A. No artigo 2 foi observado que 23,1% das crianças do GC apresentavam anemia, sendo a presença de mais de uma criança <5 anos na casa, introdução de frutas e legumes após oito meses de idade, desnutrição, hospitalização prévia e menores concentrações de folato associados ao maior risco para anemia. No artigo 3, observou-se elevada concentração mediana de folato sérico (39,7 nmol/L) e 15% de deficiência de vitamina B12 (< 148 pmol/L). O efeito combinado de altas concentrações de folato com valores de vitamina B12 $\geq$ 148 pmol/L reduziu o risco para anemia enquanto que a condição de altas concentrações de folato com baixas concentrações de vitamina B12 não foi associada a maior risco para anemia nessa população. **Conclusões** - A fortificação da alimentação complementar com MNP reduziu a prevalência de DVA e melhorou o estado nutricional desta vitamina nas crianças participantes do ENFAC. Estratégias para apoio, promoção e proteção do aleitamento materno e da alimentação complementar saudável são essenciais para a prevenção da anemia e garantia de um estado nutricional adequado de micronutrientes na infância.

Palavras-chave: Vitamina A. Anemia. Fortificação Caseira. Múltiplos Micronutrientes em pó. Alimentação Complementar.

ABSTRACT

Silva LLS. [Fortification of complementary feeding with multiple micronutrients in powder in the prevention of anemia and vitamin A status in children from Primary Health Centers] [thesis]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2017. Portuguese.

Introduction - Anemia and vitamin A deficiency (VAD) are among the major public health problems in the world. In Brazil, 20.9% of children under five years of age have anemia and 17.4% VAD. Recently, the World Health Organization recommended the use of multiple micronutrients in powder form (MNP) to promote adequate intake of vitamins and minerals in complementary feeding. Although this strategy is considered effective in the prevention of iron deficiency anemia, its impact on the nutritional status of vitamin A is still controversial.

Objectives - The objectives of this thesis were: to evaluate the impact of fortification of complementary feeding with MNP on vitamin A status (article 1), to investigate factors associated with anemia (article 2) and to assess the nutritional status of folate and vitamin B12 and explore their combined effect on anaemia risk (article 3) in young Brazilian children attended at Primary Health Centers (PHC).

Methods - This is a multicenter study, pragmatic intervention trial, carried out in 24 PHC in four Brazilian cities (Goiânia, Olinda, Porto Alegre and Rio Branco) – *Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar* (ENFAC). Data collection took place between June 2012 and June 2013. At study baseline, the control group (CG) consisted of children 10-14 months old (n = 521) attending in routine pediatric health care and, in parallel, the intervention group (IG) was composed of children between 6-8 months old (n = 462) who followed the MNP intervention once daily for a period of two to three months. In article 1, multilevel Poisson regression models were used to analyze the impact of fortification on vitamin A status, comparing the IG children, after four to six months follow-up, with the CG children. In articles 2 and 3, multilevel Poisson regression models were used to investigate risk factors for anemia (blood hemoglobin concentration <110 g/L) and the combined effect of folate and vitamin B12 status on anemia risk among CG children. **Results** - In article 1, the prevalence of VAD (serum retinol <0.7 µmol/L) in the CG was 16.2%, while in the IG was 7.5%, representing a 55% reduction in the prevalence of VAD in the IG when compared to the CG. This reduction was also significant when stratifying the study centers by coverage of the National Vitamin A

Supplementation Program. The adjusted mean of vitamin A serum concentrations improved in the IG compared with CG children, with a shift to the right in the vitamin A distribution. In article 2, it was observed that 23.1% of children in the CG had anemia, with more than one child <5 years old in the household, introduction of fruits and vegetables after eight months of age, stunting, previous hospitalization and lower concentrations of serum folate associated with increased risk for anemia. In article 3, a high median serum folate (39.7 nmol/L) and 15% of vitamin B12 deficiency (<148 pmol/L) were observed in these children. The combined effect of high serum folate concentration (≥ 50.1 nmol/L) and vitamin B12 ≥ 148 pmol/L significantly reduced the risk for anemia whereas the condition of high serum folate concentrations and low vitamin B12 concentrations was not associated with an increased risk for anemia in this population. **Conclusion** - The fortification of complementary feeding with MNP reduced the prevalence of VAD and improved the vitamin A status in children participating in the ENFAC. Strategies to support, promote and protect breastfeeding and healthy complementary feeding are essential for the prevention of anemia and ensuring an adequate nutritional status of micronutrients in childhood.

Keywords: Vitamin A. Anemia. Home fortification. Multiple Micronutrients in Powder. Complementary feeding.

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	13
1	INTRODUÇÃO	14
	1.1 EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA E DA DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A NA INFÂNCIA	14
	1.1.1 Anemia	14
	1.1.2 Deficiência de vitamina A	17
	1.2 ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DA ANEMIA E DA DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A NA INFÂNCIA	22
	1.2.1 Suplementação profilática de ferro e vitamina A	23
	1.2.2 Fortificação de alimentos	25
	1.2.3 Educação Alimentar e Nutricional	27
	1.2.4 Fortificação da alimentação infantil com múltiplos micronutrientes em pó	28
	1.3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	33
	1.4 HIPÓTESE CENTRAL DA INVESTIGAÇÃO	34
2	OBJETIVOS	35
3	MÉTODOS	36
	3.1 DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DO ESTUDO	36
	3.2 COLETA DE DADOS	38
	3.2.1 Grupo Controle	38
	3.2.2 Grupo Intervenção	39
	3.3 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	42
	3.4 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	43
	3.5 CASUÍSTICA PARA ANÁLISE	44
	3.6 DESFECHOS DE INTERESSE E VARIÁVEIS DE EXPOSIÇÃO	45
	3.6.1 Avaliação do impacto da fortificação caseira com MNP no estado nutricional de vitamina A: Artigo 1	45
	3.6.2 Análise dos fatores associados à anemia nas crianças do grupo controle do ENFAC: Artigo 2	46
	3.6.3 Análise do estado nutricional de folato e vitamina B12 nas crianças do grupo controle do ENFAC: Artigo 3	47
	3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	47
	3.8 ASPECTOS ÉTICOS	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
	4.1 ARTIGO 1: <i>“The impact of home fortification with multiple micronutrient powder on vitamin A status in young children: A multicenter pragmatic controlled trial in Brazil”</i>	50

4.2 ARTIGO 2: “ <i>Factors associated with anemia in young children in Brazil</i> ”	59
4.3 ARTIGO 3: “ <i>High serum folate and vitamin B12 status in young Brazilian children</i> ”	82
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
6 REFERÊNCIAS	105
ANEXOS	114
Anexo 1 – Artigo escrito em co-autoria submetido para a publicação: “ <i>Interaction of vitamin A and inflammatory status on vitamin D sufficiency at different latitudes in Brazilian young children</i> ”	115
Anexo 2 – Declaração referente ao cumprimento do estágio de pesquisa realizado na <i>Harvard T.H. Chan School of Public Health</i>	136
Anexo 3 – Questionário de triagem	137
Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	138
Anexo 5 – Questionário único do grupo controle	140
Anexo 6 – Questionário inicial do grupo intervenção	145
Anexo 7 – Questionário de seguimento de três meses	149
Anexo 8 – Questionário de seguimento de seis meses (avaliação final)	150
Anexo 9 – Questionário de coleta de sangue	153
Anexo 10 – Parecer de aprovação do protocolo de pesquisa	154
CURRÍCULO LATTES	155

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Atenção Básica à Saúde
ADF	Anemia por Deficiência de Ferro
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DF	Deficiência de ferro
DRI	<i>Dietary Reference Intakes</i> (Ingestão Diária Recomendada)
DVA	Deficiência de Vitamina A
EAN	Educação Alimentar e Nutricional
ENFAC	Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar
GC	Grupo Controle
GI	Grupo Intervenção
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IDHM	Índice de Desenvolvimento Humano Municipal
IMC	Índice de Massa Corporal
MNP	<i>Multiple Micronutrients in Powder</i> (Múltiplos Micronutrientes em Pó)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Proteína C-Reativa
PNDS	Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde
PNSF	Programa Nacional de Suplementação de Ferro
RAE	<i>Retinol Activity Equivalents</i> (Equivalentes de Atividade de Retinol)
RDA	<i>Recommended Dietary Allowance</i> (Necessidade Diária Recomendada)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UBS	Unidade Básica de Saúde
UI	Unidades Internacionais
UL	<i>Tolerable Upper Intake Level</i> (Níveis Máximos Toleráveis de Ingestão)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado tem como objetivo principal apresentar os resultados da avaliação do impacto da fortificação da alimentação complementar com múltiplos micronutrientes em pó no estado nutricional de vitamina A de crianças usuárias de Unidades Básicas de Saúde de quatro cidades brasileiras. Este estudo faz parte do Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar (ENFAC), cujo principal objetivo foi avaliar a efetividade desta estratégia na prevenção da anemia e deficiência de ferro em crianças menores de um ano atendidas na Atenção Básica à Saúde.

A partir dos resultados favoráveis obtidos sobre a efetividade da fortificação com múltiplos micronutrientes em pó na melhoria do estado nutricional de vitamina A, publicados no periódico *Maternal and Child Nutrition* em 2016 (**Artigo 1**), prosseguimos as análises dos dados visando identificar os fatores associados ao risco para anemia (**Artigo 2**, submetido à publicação) e o estado nutricional de folato e vitamina B12 (**Artigo 3**, em preparação) nas crianças do grupo controle do ENFAC, cenário de saúde infantil vigente antes da intervenção com os múltiplos micronutrientes em pó.

Sendo assim, esta tese foi elaborada segundo as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP (3ª edição), estilo Vancouver, publicada em 2016, e pelo Guia de Apresentação de Teses da Faculdade de Saúde Pública, 2ª edição atualizada em 2017, sendo apresentada sob a forma de artigos. Está apresentada em cinco partes que compreende uma contextualização do tema e justificativa do estudo, a apresentação dos objetivos propostos, a descrição do delineamento do estudo e métodos empregados, os resultados e discussão (composta pelos três artigos científicos citados anteriormente) e, finalmente, pelas considerações finais. Nos anexos, consta um artigo em co-autoria sobre os fatores associados ao estado nutricional de vitamina D nas crianças do grupo controle do ENFAC, submetido para publicação (Anexo 1).

O ENFAC recebeu financiamento da Coordenação-Geral de Alimentação e Nutrição do Ministério da Saúde, com gerência administrativo-financeiro do CNPq (processo nº 552747/2011-4). Os artigos 1 e 2 da presente tese foram elaborados durante estágio de pesquisa na *Harvard T.H. Chan School of Public Health, Harvard University*, Boston, MA, EUA, sob supervisão do Prof. Dr. Wafaie W. Fawzi (Anexo 2) com bolsa concedida pelo CNPq (processo nº 200487/2015-9). A doutoranda também recebeu bolsa de estudos da CAPES no período de setembro de 2016 até a data da defesa da presente tese.

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA E DA DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A NA INFÂNCIA

1.1.1 Anemia

A anemia, definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como baixas concentrações de hemoglobina no sangue, constitui-se como um dos principais problemas de saúde pública do mundo (WHO, 2015). Presente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, porém com maior magnitude e gravidade nos países em desenvolvimento, esta condição afeta 1,62 bilhão de pessoas no mundo, o que representa um quarto da população mundial (MCLEAN et al., 2009).

Crianças em idade pré-escolar estão entre os grupos populacionais de maior risco para a anemia (MCLEAN et al., 2009). Em 2011, estima-se que 273,2 milhões de crianças com idade entre seis e 59 meses apresentaram anemia, o que representa 42,6% dessa população globalmente. A África é a região com maior prevalência de anemia em pré-escolares (62,3%), seguida pela região do Sudeste Asiático (53,8%) e região do Mediterrâneo Oriental (48,6%) (Figura 1) (WHO, 2015).

Fonte: WHO, 2015.

Figura 1 – Estimativas globais da prevalência de anemia em crianças entre seis e 59 meses de idade em 2011.

No Brasil, segundo dados da Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS) realizada em 2006, único inquérito nacional que avaliou esta condição na infância, 20,9% das crianças menores de cinco anos apresentavam anemia. As Regiões Nordeste (25,5%), Sudeste (22,6%) e Sul (21,5%) do país apresentavam as maiores prevalências enquanto as regiões Centro-Oeste (11%) e Norte (10,4%) as prevalências mais baixas de anemia nesta população (BRASIL, 2009).

Estudos transversais pontuais realizados em diferentes locais no Brasil identificaram prevalências ainda mais elevadas de anemia em crianças (JORDÃO et al., 2009; VIEIRA e FERREIRA, 2010). Um artigo de revisão com 53 estudos conduzidos no período de 1996 a 2007 identificou uma prevalência mediana de anemia de 53% entre as crianças menores de cinco anos, sendo as maiores prevalências observadas naquelas menores de 24 meses de idade (JORDÃO et al., 2009). Em outro estudo de revisão, que buscou estimar a prevalência de anemia em diferentes cenários epidemiológicos, observou altas prevalências de anemia em crianças que frequentavam creches e escolas (52%), naquelas usuárias de serviços de saúde (60,2%), e nas crianças pertencentes às populações em situação de iniquidades sociais (66,5%) (VIEIRA e FERREIRA, 2010).

A anemia na infância desperta particular interesse não somente por sua elevada prevalência no Brasil e no mundo, mas também por sua capacidade de afetar negativamente o desenvolvimento futuro dos indivíduos (BLACK et al., 2011). Essa condição, principalmente causada pela deficiência de ferro (DF), pode levar a um comprometimento do desenvolvimento cognitivo e neuropsicomotor na infância, interferindo diretamente na capacidade de aprendizagem, acompanhada de uma diminuição da capacidade produtiva na vida adulta (STOLTZFUS et al., 2004; BALARAJAN et al., 2011). Quando presente principalmente nos dois primeiros anos de vida, essas consequências se agravam pelo alto risco de se tornarem irreversíveis, mesmo após a resolução do quadro de anemia por deficiência de ferro (ADF) (BLACK et al., 2011).

A anemia é resultado de uma diminuição na produção dos eritrócitos, decorrente de um comprometimento do processo de proliferação celular e/ou maturação dos eritrócitos; ou por um aumento da perda dessas células, seja pela perda de sangue ou destruição dessas células; ou ambos. E esses processos são fortemente determinados por fatores nutricionais, doenças infecciosas e distúrbios genéticos (BALARAJAN et al., 2011).

A anemia nutricional, causada pela deficiência de um ou mais nutrientes essenciais para a síntese de hemoglobina e eritrócitos na medula óssea, tais como o ferro, vitamina A, folato e vitamina B12, é a principal causa da anemia na infância (KRAEMER e ZIMMERMANN,

2007). E dentre essas deficiências nutricionais destaca-se a DF, que é responsável por aproximadamente 50% dos casos de anemia, proporção esta que pode variar substancialmente entre regiões e países (WHO, 2015).

O ferro desempenha papel fundamental na eritropoiese contribuindo para a produção da hemoglobina nos últimos estágios da diferenciação do eritrócito. Baixas concentrações de ferro no organismo produz eritrócitos microcíticos e hipocrômicos, resultante de baixa concentração de hemoglobina nessas células, que vão comprometer significativamente o transporte de oxigênio aos tecidos e órgãos (KYRIAZI, 2011). Além dessa função na eritropoiese, o ferro também desempenha papel importante na imunidade mediada por células, sendo que sua deficiência leva a um aumento da predisposição a infecções (BHASKARAM, 2002).

No mundo, a DF é considerada a carência nutricional de maior magnitude. Apesar de não dispormos de estimativas globais da prevalência dessa deficiência, a prevalência de anemia é utilizada como uma *proxi* da DF, estimando que para cada caso de ADF exista de 1 a 2,5 casos de DF sem anemia (BOY et al., 2009).

As principais causas da DF na infância são: baixos estoques de ferro no nascimento (que está diretamente associado ao estado nutricional materno de ferro); elevada demanda de ferro nessa fase da vida; baixa ingestão de alimentos fonte de ferro; ingestão de alimentos que interferem a biodisponibilidade desse micronutriente; e as perdas crônicas de ferro (LOZOFF et al., 2006). Além desses fatores biológicos (relacionados ao desequilíbrio entre oferta, demanda e perdas), sabe-se que os fatores determinantes da DF são múltiplos, e envolvem também aspectos socioeconômicos e culturais (OSÓRIO et al., 2002).

A deficiência de outros micronutrientes, como é o caso do folato, vitamina B12 e vitamina A, também colaboram com o desenvolvimento da anemia, mesmo que em menor proporção (FISHMAN, 2000; VILLALPANDO et al., 2006; CARDOSO et al., 2012).

O folato e a vitamina B12 desempenham seu papel na eritropoiese por meio da síntese do DNA, processo esse imprescindível para a divisão e proliferação celular. Em casos de carência desses micronutrientes, há, portanto, uma síntese inadequada de DNA, com consequente lentidão no processo de maturação e divisão celular e aumento da destruição prematura das células na medula óssea, liberando para o sangue novos eritócitos de tamanho aumentado, com alterações morfológicas específicas, e em menor quantidade, quadro este conhecido como anemia megaloblástica (FISHMAN, 2000).

No entanto, estudos realizados com escolares na Colômbia e Guatemala encontraram uma associação inversa entre as concentrações de hemoglobina sanguínea e o estado

nutricional de folato (ARSENAULT et al., 2009; ROGERS et al., 2003), sendo essa associação ainda mais forte nos escolares com baixas concentrações de vitamina B12 (ARSENAULT et al., 2009). Nos Estados Unidos, um estudo realizado com idosos também identificou que elevadas concentrações de folato sérico foi associado ao risco para anemia naqueles indivíduos com baixas concentrações de vitamina B12 (MORRIS et al., 2007). Os mecanismos que explicam a associação inversa entre as concentrações de hemoglobina e o estado nutricional de folato, principalmente em indivíduos com baixas concentrações de vitamina B12, ainda não foram elucidados (ARSENAULT et al., 2009). Mais estudos precisam ser realizados para confirmar essa associação e esclarecer os mecanismos envolvidos nesse processo.

A vitamina A, por sua vez, parece estar envolvida na patogênese da anemia por agir diretamente na diferenciação e proliferação das células hematopoiéticas pluripotentes, precursoras dos eritrócitos; por atuar na absorção e mobilização das reservas de ferro no organismo; e ainda por aumentar a resistência às infecções e, assim, prevenir o comprometimento da eritropoiese pela melhoria dos níveis de ferro circulante (SEMBA e BLOEM, 2002).

Além desses fatores nutricionais, outra importante causa da anemia, principalmente em países em desenvolvimento, é a presença de doenças infecciosas. Essas doenças podem contribuir para o desenvolvimento da anemia tanto pela diminuição da absorção e metabolismo do ferro e de outros micronutrientes, quanto pelo aumento da perda de sangue e destruição eritrocitária. Infecções helmínticas, malária, esquistosomose e HIV/AIDS são os principais exemplos de doenças infecciosas que estão relacionadas ao desenvolvimento desta condição (BALARAJAN et al., 2011).

Por fim, polimorfismos genéticos da hemoglobina, também denominados hemoglobinopatias, também contribuem para o desenvolvimento de anemia por produzirem moléculas presentes na hemoglobina estruturalmente anormais ou por uma síntese desbalanceada de globina. Embora ainda não se conheça a contribuição desses distúrbios na carga global de anemia, estima-se que aproximadamente 7% da população mundial apresenta algum tipo de hemoglobinopatia, sendo as talassemias e a anemia falciforme as mais prevalentes (WEATHERALL, 2008; BALARAJAN et al., 2011).

1.1.2 Deficiência de Vitamina A

A deficiência de vitamina A (DVA), juntamente com as deficiências de ferro, folato, iodo e zinco, são as principais carências nutricionais no mundo (BAILEY et al., 2015).

Lactentes e crianças em idade pré-escolar constituem o grupo de maior vulnerabilidade para essas deficiências devido a alta demanda de vitaminas e minerais nessa fase da vida, justificada pelo rápido crescimento e desenvolvimento, além da exposição a múltiplas doenças que diminuem a absorção desses micronutrientes e aumentam consideravelmente sua utilização biológica e excreção (PRIETO e CID, 2011; DEWEY, 2013).

Dentre as principais deficiências nutricionais, destaca-se a DVA. Globalmente, a DVA é considerada uma das deficiências nutricionais mais prevalentes, afetando principalmente crianças de países menos desenvolvidos (WHO, 2009). Embora evidências mostrem uma redução importante na prevalência desta deficiência em crianças de seis a 59 meses de idade nos últimos 20 anos (de 39% em 1991 para 29% em 2013), a DVA continua a ser um sério problema de saúde pública na maioria dos países de renda média e baixa (STEVENS et al., 2015) (Figura 2).

Fonte: STEVENS et al., 2015.

Figura 2 – Estimativas da prevalência de deficiência de vitamina A em crianças com idade entre seis e 59 meses por país em 2013.

Países da África Subsaariana e do sul da Ásia são os mais afetados por esta deficiência, com prevalências de 48% e 44%, respectivamente (STEVENS et al., 2015). Nos países da América do Sul e Central, as prevalências de DVA oscilam de 0,3% na Guatemala a 32% no Haiti (CEDIEL et al., 2015). Em países mais desenvolvidos, como é o caso dos Estados Unidos, maiores prevalências desta deficiência são encontradas em populações com menor

poder socioeconômico, com condições sanitárias precárias e sem acesso aos serviços de saúde (SHERWIN et al., 2012). Na Europa, por não ser considerada uma área de risco para esta deficiência, os estudos que avaliam a DVA nesta população são escassos (MILAGRES et al., 2007).

No Brasil, o único inquérito nacional que avaliou a prevalência de DVA em crianças menores de cinco anos foi a PNDS, realizada em 2006, que identificou que 17,4% das crianças dessa faixa etária apresentavam níveis inadequados de vitamina A. Segundo esta pesquisa, as regiões Sudeste e Nordeste do país foram as mais afetadas por esta deficiência (21,6% e 19,0%, respectivamente), seguidas pelas regiões Centro-Oeste (11,8%), Norte (10,7%) e Sul (9,9%) (BRASIL, 2009).

Estudos transversais pontuais realizados no Brasil apontam a prevalência de DVA entre 7 e 44,8% em crianças menores de cinco anos (Tabela 1). Com exceção de dois estudos realizados em Recife (PE), a DVA pode ser considerada problema moderado ou grave de saúde pública, segundo critérios adotados pela OMS (WHO, 2011a).

As consequências da DVA na infância são também preocupantes. Essa deficiência é a principal causa de cegueira evitável em crianças e contribui para o aumento das mortes e doenças infecciosas nesta faixa etária pela diminuição da resistência imunológica a doenças como sarampo, diarreia e malária, além de contribuir para o surgimento da anemia (WHO, 2009; MCLAREN e KRAEMER, 2012).

O principal determinante para a ocorrência da DVA é uma dieta cronicamente insuficiente de vitamina A para atender as necessidades fisiológicas do indivíduo (WHO, 2009). E quando se trata de crianças menores de dois anos, esse baixo consumo pode ser decorrente de práticas inadequadas de aleitamento materno, como o desmame precoce, e da introdução de uma alimentação complementar não saudável e em tempo inoportuno (MCLAREN e KRAEMER, 2012).

Segundo a OMS, a recomendação diária de ingestão de vitamina A para crianças de zero a seis meses de idade é de 375 µg equivalentes de atividade de retinol (RAE) e para crianças de seis meses a três anos é de 400 µg RAE (WHO, 2004). Já as recomendações americanas, conhecidas como *Dietary Reference Intakes (DRI)*, estabelecem a ingestão de 400 µg RAE/dia para as crianças de zero a seis meses de idade, 500 µg RAE/dia para aquelas entre seis e 12 meses de idade, e 300 µg RAE/dia para as crianças com idade entre um e três anos (IOM, 2001).

Tabela 1 – Concentração média de retinol sérico e frequência da deficiência de vitamina A (DVA) em crianças menores de cinco anos em estudos transversais brasileiros realizados entre 1998 e 2013¹.

Autores/ano	Local	Ano do estudo	Faixa etária (meses)	Número amostral	Média de retinol sérico (μmol/L)	Frequência de DVA² (%)	Método de análise do retinol sérico	Tipo de coleta	Problema de saúde pública³
Martins et al., 2004	Sergipe (Base populacional)	1998	6-60	607	0,87 ± 0,38	32,1	Cromatografia líquida de alta resolução	Venosa	Grave
Fernandes et al., 2005	Recife (PE) (Creches públicas)	1999	6-59	311	1,22 ± 0,36	7,0	Cromatografia líquida de alta resolução	Venosa	Leve
Vasconcelos e Ferreira, 2009	Alagoas (Região semi-árida)	2007	0-59	652	0,82 ± 0,52	44,8	Cromatografia líquida de alta resolução	Venosa	Grave
Barros et al., 2010	Belo Horizonte (MG) (Região metropolitana)	2007	6-24	173	1,0 ± 0,4	17,7	Cromatografia líquida de alta eficiência	Venosa	Moderado
Azevedo et al., 2010	Recife (PE) (Creches públicas)	2007	24-60	344	1,16 ± 0,33	7,7	Cromatografia líquida de alta resolução	Venosa	Leve
Garcia et al., 2011	Acrelândia (AC) (Base populacional)	2007/2008	6-24	133	-	14,9	Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa	Venosa	Moderado
Netto et al., 2012	Viçosa (MG) (Serviço de saúde)	-	18-24	101	0,76 (0,31 –1,40) ⁴	39,6	Cromatografia líquida de alta eficiência	Venosa	Grave
Queiroz et al., 2013	Paraíba (Base populacional)	2007	6-59	1211	0,90 ± 0,24	21,8	Cromatografia líquida de alta eficiência	Venosa	Grave
Miglioli et al., 2013	Pernambuco (Base populacional)	2006	6-59	790	-	16,1	Cromatografia líquida de alta eficiência	-	Moderado
Lobo, 2013	Goiânia (GO) (Creches municipais)	2005/2006	6-24	193	1,00 ± 0,38	21,7	Cromatografia líquida de alta eficiência	Venosa	Grave

Saraiva et al., 2014	Vitória (ES) (Serviço de saúde)	2008	12-59	692	$0,85 \pm 0,25$	24,7%	Método espectrofotométrico	Venosa	Grave
Pedraza et al., 2014	Paraíba (Creches públicas)	2008/ 2009	12-59	193	-	24,4%	Cromatografia líquida de alta eficiência	Venosa	Grave
Silva et al., 2015	Goiânia (GO) (Serviço de saúde)	2012/ 2013	12-16	228	$1,3 (0,9 - 1,8)^4$	14%	Cromatografia líquida de alta eficiência	Venosa	Moderado
Novaes et al., 2016	Vitória da Conquista (BA) (Creches públicas)	2012	24-60	303	$1,99 \pm 1,17$	13,1%	Cromatografia líquida de alto desempenho	-	Moderado

¹Tabela adaptada e atualizada da dissertação de mestrado de Lara Livia Santos da Silva (SILVA, 2014); ²Retinol sérico <0,7 µmol/L (<20 µg/dL); ³Critérios adotados pela OMS (WHO, 2011a): Problema de saúde pública leve (prevalência ≥ 2% e <10%), problema de saúde pública moderado (prevalência ≥ 10% e < 20%) e problema de saúde pública grave (prevalência ≥ 20%); ⁴Mediana (min-máx).

A vitamina A pode ser encontrada tanto em alimentos de origem animal, na sua forma pré-formada, quanto em alimentos de origem vegetal, na forma de carotenóides pró-vitamina A. As fontes de vitamina A pré-formada são fígado, leite integral e derivados, e ovos; e entre os carotenóides pró-vitamina A se destacam os vegetais folhosos verde-escuros, vegetais e frutos amarelo-alaranjados e os óleos vegetais (CRIBB et al., 2013). O leite materno é uma das principais fontes de vitamina A para o lactente, e sua concentração pode variar de acordo com a ingestão materna, sendo a média estimada em aproximadamente 500 µg/L de vitamina A em mulheres com estado nutricional adequado (WHO, 1998).

Outro fator importante para o desenvolvimento da DVA em crianças é a presença de processos infecciosos (MILLER et al., 2002). Quadros de infecções frequentes, especialmente que causam diarreia e problemas respiratórios, podem precipitar ou agravar a DVA nesta fase da vida tanto pela redução da ingestão alimentar e absorção de nutrientes, como pela depleção dos estoques corporais dessa vitamina pelo aumento do catabolismo causado pela febre e pela excreção urinária do retinol (STEPHENSEN, 2001; MILLER et al., 2002). É importante ressaltar que a DVA também atua como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças infecciosas na infância pela diminuição da resistência imunológica e redução da integridade física e biológica do tecido epitelial, que é a primeira barreira contra infecções, gerando um ciclo vicioso entre esta carência nutricional e os processos infecciosos (STEPHENSEN, 2001).

1.2 ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DA ANEMIA E DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A NA INFÂNCIA

Atualmente, são três as principais estratégias recomendadas para a prevenção e controle da anemia e da DVA em crianças: suplementação profilática de ferro e vitamina A; fortificação de alimentos; e a diversificação alimentar (WHO, 2009; WHO, 2015). Especificamente para a prevenção e controle da anemia, a OMS também recomenda a fortificação da alimentação infantil com múltiplos micronutrientes em pó (MNP) (WHO, 2016a).

Além dessas estratégias, a promoção do aleitamento materno, o controle de infecções e parasitoses, e a melhoria no acesso à água tratada e saneamento básico também são ações utilizadas com este propósito (WHO, 2009; WHO, 2015).

1.2.1 Suplementação profilática de ferro e vitamina A

A suplementação de ferro é a principal intervenção que vem à mente quando se refere à prevenção e controle da anemia na infância. Atualmente, a OMS recomenda essa estratégia em locais onde a prevalência de anemia em crianças é um problema de saúde pública, segundo dois esquemas de suplementação: suplementação diária de ferro e suplementação intermitente de ferro (WHO, 2011b; WHO, 2016b).

A suplementação diária de ferro destina-se a crianças de seis meses a 12 anos de idade em locais onde a prevalência de anemia em crianças é de 40% ou mais (WHO, 2016b). Já a suplementação no regime intermitente (ex: uma, duas ou três vezes por semana em dias não consecutivos), é a intervenção recomendada para crianças de 2 a 12 anos de idade em locais onde a prevalência desse distúrbio está entre 20% e 40% (WHO, 2011b).

O grande desafio dessa estratégia é a aceitabilidade e adesão por parte dos indivíduos, principalmente devido aos efeitos colaterais associados à suplementação (ex: desconforto gastrointestinal, constipação, diarreia e escurecimento dos dentes). Caso não haja uma conscientização da população em relação a importância da suplementação com ferro para a prevenção da anemia, esses problemas podem limitar sua efetividade (WHO, 2016b).

No Brasil, essa estratégia se dá por meio do Programa Nacional de Suplementação de Ferro (PNSF), instituído pela Portaria nº 730 de 13 de maio de 2005, que consiste na suplementação profilática de ferro às crianças, gestantes e mulheres no pós-parto e/ou pós-aborto. Essa ação tem como principal objetivo a prevenção e combate da ADF no país (BRASIL, 2013a). Assim que foi criado, esse Programa realizava a suplementação de ferro de crianças de seis a 18 meses de idade em esquema intermitente (uma vez por semana), com a utilização de um xarope de sulfato ferroso. Após divulgação de estudos conduzidos no Brasil que identificaram baixa adesão a essa estratégia e efetividade reduzida do esquema semanal em

detrimento do diário (CEMBRANEL et al., 2013), o PNSF passou por um processo de revisão em 2013 e atualmente adota a suplementação diária, em gotas, para crianças de 6 a 24 meses de idade (BRASIL, 2013a).

A suplementação de vitamina A, por sua vez, é considerada uma das intervenções nutricionais mais bem-sucedidas do mundo e grande parte desse sucesso está na adesão a essa estratégia, que é realizada duas vezes por ano e, na maioria das vezes, em conjunto com as campanhas nacionais de vacinação (BAILEY et al., 2015).

A suplementação de vitamina A consiste na administração de uma dose única de 100.000 UI de vitamina A para crianças de seis a 11 meses de idade e o dobro da dose, em esquema semestral, para crianças de 12 a 59 meses de idade. Pelo papel desempenhado por este micronutriente no sistema imunológico, a suplementação com vitamina A é recomendada para reduzir a morbidade e mortalidade infantil em populações onde a DVA é um problema de saúde pública (WHO, 2011c).

Em 2016, mais de 70% das crianças com idade entre seis e 59 meses de países prioritários (aqueles que apresentam elevada taxa de mortalidade infantil, onde a DVA é um problema de saúde pública e/ou possuem histórico de suplementação com vitamina A) receberam duas doses anuais de suplementos dessa vitamina, sendo a cobertura ainda superior nos países menos desenvolvidos, alcançando cerca de 87% das crianças dessa faixa etária (UNICEF, 2017).

No Brasil, essa estratégia é realizada por meio do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A, criado em 1983 e instituído pela Portaria nº 729 de 13 de maio de 2005, que distribui cápsulas com megadoses de vitamina A para crianças de seis a 59 meses de idade, em esquema proposto pela OMS (BRASIL, 2013b). Inicialmente, esse Programa atendia somente as regiões de maior prevalência desta deficiência no país (região Nordeste e municípios do Vale do Jequitinhonha e Mucuri no Estado de Minas Gerais), porém, em 2010, foi ampliado para os municípios que compõem a Amazônia Legal e, em 2012, com o lançamento da Ação Brasil Carinhoso, o programa foi expandido para todos os municípios da Região Norte, 585 municípios integrantes do Plano Brasil Sem Miséria das Regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste, e todos os Distritos Sanitários Especiais Indígenas (BRASIL, 2013b).

Apesar de ser uma intervenção fortemente recomendada por organizações internacionais e adotada por vários países no mundo (WHO, 2011c; UNICEF, 2017), alguns pesquisadores têm, recentemente, questionado sua efetividade nos dias atuais (LATHAM, 2010; KAPIL e SACHDEV, 2013; MASON et al., 2015). Esses pesquisadores se baseiam no fato de que os estudos que embasaram essas recomendações foram realizados nas décadas de 80 e 90, podendo essa estratégia não ser mais efetiva diante de um melhor perfil de saúde e nutrição das crianças atualmente. Esses pesquisadores destacam ainda que essa intervenção é pouco eficaz na redução da DVA subclínica uma vez que altas doses de vitamina A melhoram o estado nutricional dessa vitamina somente nos três primeiros meses pós-suplementação, e, por esta razão, outras intervenções que ofereçam quantidades frequentes de vitamina A, em doses fisiológicas, são mais adequadas para prevenir e controlar a DVA nesta população (LATHAM, 2010; KAPIL e SACHDEV, 2013; MASON et al., 2015).

Apesar dessas evidências, a OMS continua recomendando essa estratégia para a prevenção da morbimortalidade infantil em regiões onde a DVA é um problema de saúde pública (WHO, 2017) e recomenda que essa suplementação faça parte de um programa mais abrangente e integrado que inclua outras estratégias que melhoram a ingestão de vitamina A, tais como a diversificação alimentar e fortificação de alimentos (WHO, 2011c).

1.2.2 Fortificação de alimentos

A fortificação dos alimentos é uma das principais estratégias para a prevenção e controle das carências nutricionais no mundo. Em 2015, mais de 140 países possuíam programas de iodação do sal, 86 tinham programas de fortificação mandatória de, pelo menos, um micronutriente em cereais, e 49 contavam com a fortificação mandatória de óleos comestíveis (NEUFELD, 2017).

Essa estratégia tem como vantagens a alta cobertura populacional, não requer a modificação dos hábitos alimentares, é socialmente aceita e apresenta baixo risco de toxicidade. No entanto, apresenta algumas limitações: pela necessidade do processo industrial, alguns países menos desenvolvidos não dispõem ou possuem acesso limitado a esses alimentos fortificados; por não promover a mudança de hábitos

alimentares inadequados, o indivíduo pode permanecer deficiente em outros micronutrientes; e, por não conter quantidades significativas de vitaminas e minerais, não é eficaz em locais com altas prevalências dessas deficiências nutricionais (ALLEN et al., 2006). Além disso, não é uma estratégia interessante para a prevenção das carências de micronutrientes em crianças, especialmente daquelas menores de dois anos, porque os alimentos comumente fortificados não são indicados para o consumo nessa faixa etária (BRASIL, 2002a).

O Brasil adota, desde 2004, a fortificação mandatória das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico com o objetivo de prevenir e controlar a anemia e reduzir a prevalência de defeitos do tubo neural na população brasileira (BRASIL, 2002b). Diante de evidências no contexto brasileiro da ausência de impacto dessa estratégia na prevalência de anemia em crianças (ASSUNÇÃO et al., 2012), elevada inadequação do consumo de ferro em mulheres em idade reprodutiva (VIEIRA et al., 2017) e para estar de acordo com as recomendações da OMS (ALLEN et al., 2006), o governo decidiu atualizar a RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002 que determinava que todas as farinhas de trigo e milho comercializadas no Brasil fossem fortificadas com, no mínimo, 4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico por 100g de farinha (BRASIL, 2002b), pela RDC nº150 de 13 de abril de 2017, que estabelece novas faixas de fortificação de ferro (4 a 9 mg de ferro/100g de farinha) e ácido fólico (140 a 220 µg/100g de farinha); altera os compostos de ferro permitidos para a fortificação, dando prioridade para aqueles de maior biodisponibilidade; e estipulou a obrigatoriedade de informações no rótulo desses produtos que esclarecem ao consumidor o objetivo da fortificação e a faixa de enriquecimento (BRASIL, 2017a). Novos estudos são agora necessários para avaliar a efetividade dessa nova resolução na prevenção e controle da anemia na população brasileira.

No que tange a fortificação de alimentos com vitamina A, inúmeros países tem tido sucesso na adoção dessa estratégia para melhorar o estado nutricional dessa vitamina de sua população. Óleos, gorduras, margarinas, açúcar, trigo e farinhas de milho e de arroz são os alimentos mais comumente fortificados com vitamina A (ALLEN et al., 2006).

No entanto, o Brasil, mesmo dispondo de alimentos fortificados com essa vitamina no mercado, ainda não optou por essa ação como estratégia de saúde

pública, pois alega falta de dados epidemiológicos que embasem de forma segura a fortificação universal de alimentos para o controle desta deficiência no país (BRASIL, 2007).

1.2.3 Educação Alimentar e Nutricional

Juntamente com as ações de suplementação e fortificação de alimentos, a OMS recomenda a diversificação alimentar e o incentivo ao consumo de alimentos fonte de ferro e vitamina A para a prevenção da anemia e da DVA na infância (WHO, 2009; WHO, 2015). No Brasil, essa estratégia acontece prioritariamente na Atenção Básica à Saúde por meio das ações de Educação Alimentar e Nutricional (EAN) (BRASIL, 2012a).

A EAN integra o conjunto de estratégias voltadas à promoção da alimentação adequada e saudável (PAAS), que segundo a Política Nacional de Alimentação e Nutrição é compreendida como “um conjunto de estratégias que proporcionem aos indivíduos e coletividades a realização de práticas alimentares apropriadas aos seus aspectos biológicos e socioculturais, bem como ao uso sustentável do meio ambiente” (BRASIL, 2012b). Por meio de ações de incentivo, apoio e proteção à alimentação adequada e saudável, as ações de EAN, quando bem executadas, podem influenciar diretamente o estado nutricional do indivíduo, e consequentemente, prevenir carências nutricionais específicas.

Os principais instrumentos para a realização das ações de PAAS no Brasil são o Guia Alimentar para a População Brasileira e o Guia Alimentar para as Crianças Menores de Dois Anos. O Guia Alimentar para a População Brasileira apresenta as diretrizes de uma alimentação saudável, com mensagens específicas direcionadas para a população em geral e profissionais de saúde (BRASIL, 2014). Já o Guia Alimentar para as Crianças Menores de Dois Anos traz mensagens sobre a promoção do aleitamento materno e da alimentação complementar adequada, saudável e em tempo oportuno, com vistas à melhoria da alimentação das crianças dessa faixa etária no país (BRASIL, 2010).

Além desses instrumentos, para potencializar as ações de PAAS voltadas às crianças menores de dois anos, o Brasil conta também com a Estratégia Amamenta e Alimenta Brasil, que tem por finalidade a qualificação do processo de trabalho dos

profissionais da atenção básica para o fortalecimento das ações voltadas à promoção do aleitamento materno e da alimentação complementar (BRASIL, 2015a).

Para alguns pesquisadores, a PAAS deveria ser a principal intervenção para prevenção e controle das carências nutricionais porque, além de ser a solução mais sustentável e de melhor custo-benefício, contribui para a melhoria do estado nutricional geral de micronutrientes, além de proteger as crianças contra infecções e outras doenças (GREINER, 2013; KAPIL e SACHDEV, 2013).

No entanto, é importante ressaltar que, quando se trata da alimentação de lactentes e pré-escolares deve-se considerar as altas demandas de vitaminas e minerais nessa fase da vida, muitas vezes não supridas somente pela alimentação (DEWEY, 2013). Neste caso, organizações internacionais recomendam a utilização de estratégias complementares e combinadas, baseadas no estímulo à ingestão de vitaminas e minerais por meio da fortificação ou suplementação, para que se alcance maior redução na prevalência das carências nutricionais e suas consequências na infância (WHO, 2009; WHO, 2015; UNICEF, 2017).

1.2.4 Fortificação da alimentação infantil com múltiplos micronutrientes em pó

Em 2011, a OMS publicou um informe técnico sugerindo o uso da fortificação caseira com múltiplos micronutrientes em pó (MNP) para prevenir a anemia e a deficiência de ferro em crianças entre seis e 23 meses de idade (WHO, 2011d). O produto utilizado para a fortificação é uma mistura de ferro e outros micronutrientes na forma de pó que vem em pequenos sachês que são polvilhados em uma porção individual de qualquer alimento semissólido pronto para o consumo (ZLOTKIN e TONDEUR, 2007).

Mais recentemente, em 2016, este documento foi atualizado e passou por algumas modificações: o termo “fortificação caseira” foi substituído por “*point-of-use fortification*”, por entender que esta intervenção pode ser realizada em diversos locais (como escolas, berçários, abrigos, campos de refugiados, dentre outros) e não somente em casa; e a população coberta por esta estratégia foi ampliada, incluindo agora crianças de seis meses a 12 anos de idade (WHO, 2016a).

A fortificação com MNP possui inúmeras vantagens: proporciona à criança uma completa dose de micronutrientes quando é misturado em uma pequena quantidade de comida, apresenta boa aceitabilidade, produz menos efeitos colaterais que suplementos oferecidos entre as refeições, é leve, simples de estocar e transportar, fácil de usar, relativamente barato e é improvável que cause intoxicação. Além disso, pelo fato do ferro ser encapsulado em camada lipídica, previne a interação deste micronutriente com os alimentos, evitando possíveis mudanças na cor, cheiro e gosto dos alimentos (ZLOTKIN e TONDEUR, 2007; DE-REGIL et al., 2011).

Em relação aos efeitos colaterais associados ao uso do sachê com MNP, a maioria dos estudos que avaliaram a eficácia e efetividade dessa estratégia em crianças destaca que menos de 1% dos cuidadores relataram aumento na frequência de vômitos, obstipação ou diarreia. No entanto, ainda não foi possível confirmar se a causa dessas alterações gastrointestinais realmente está vinculada ao uso do produto (HFTAG, 2016).

Em 2011, o esquema da fortificação com MNP sugerido pela OMS para melhorar o estado nutricional de ferro e reduzir a anemia em crianças de seis a 23 meses de idade consistia no uso de um sachê com MNP uma vez ao dia, por um período de dois meses, seguido de um período de três a quatro meses sem a fortificação (WHO, 2011d). Em 2016 essa conduta foi alterada passando a ser o uso de 90 sachês por um período de seis meses (WHO, 2016a). Em ambas as recomendações, o sachê de MNP deve conter, no mínimo, ferro, vitamina A e zinco e essa estratégia deve ser realizada em locais onde a prevalência de anemia em crianças menores de cinco anos é de 20% ou mais (WHO, 2011d; WHO, 2016a).

Duas revisões sistemáticas foram conduzidas para avaliar o efeito e segurança da fortificação com MNP em crianças de seis a 23 meses de idade e em crianças de dois a 12 anos de idade. Os resultados dessas duas revisões estão detalhados no documento técnico da OMS (WHO, 2016a). Para crianças de seis a 23 meses de idade, o uso da fortificação com MNP reduziu em 26% e 52% a prevalência de anemia e DF, respectivamente, em comparação com as crianças que receberam placebo ou nenhuma intervenção. E as crianças entre dois e 12 anos de idade que

receberam a fortificação tiveram menor chance de ter anemia em relação àquelas que não receberam a fortificação (WHO, 2016a).

Por conter outros micronutrientes além do ferro, alguns estudos têm sido realizados para avaliar o impacto dessa estratégia no estado nutricional de outros micronutrientes. Especificamente para a vitamina A, os estudos ainda são escassos e contraditórios (DE-REGIL et al., 2011).

Em busca na literatura, foram identificados até o momento apenas cinco estudos que investigaram o impacto dessa estratégia no estado nutricional de vitamina A de crianças menores de dois anos de idade (Tabela 2). Conforme apresentado na Tabela 2, os achados são conflitantes e os estudos apresentam diferenças em relação a prevalência de distúrbios nutricionais na população estudada, duração do estudo, quantidade de vitamina A nos sachês e cobertura da suplementação de vitamina A na região (ZLOTKIN et al., 2003; JACK et al., 2012; SUCHDEV et al., 2012; SERDULA et al., 2013; SOOFI et al., 2013).

A maioria dos estudos não encontrou associação entre o uso da fortificação com MNP e a melhoria do estado nutricional de vitamina A (ZLOTKIN et al., 2003; JACK et al., 2012; SERDULA et al., 2013; SOOFI et al., 2013), porém um estudo realizado com crianças quenianas de seis a 35 meses de idade observou redução na prevalência de DVA em 7,5% nas crianças que receberam a fortificação em comparação com um aumento de 2,5% na prevalência dessa deficiência nas crianças que não receberam a fortificação (SUCHDEV et al., 2012). Todos os estudos atribuíram, tanto para a ausência quanto para a presença de impacto, a cobertura da suplementação de vitamina A na região.

Em 2014, o Brasil adotou a fortificação da alimentação infantil com MNP para crianças de seis a 48 meses de idade atendidas em creches participantes do Programa Saúde na Escola. Essa ação, denominada Estratégia de fortificação da alimentação infantil com micronutrientes em pó – NutriSUS, é uma ação optativa que tem por objetivo potencializar o pleno desenvolvimento infantil assim como a prevenção das deficiências nutricionais na primeira infância (BRASIL, 2015b). Em 2017, 1036 municípios aderiram a esta estratégia, o que representa 18,6% dos municípios brasileiros. Ações voltadas à expansão e maior sustentabilidade dessa estratégia são necessárias para prevenção da anemia e carências de micronutrientes no país.

Tabela 2 – Estudos internacionais selecionados sobre impacto da fortificação da alimentação complementar com múltiplos micronutrientes em pó no estado nutricional de vitamina A.

Autor/ ano	Local	Amostra	Perfil de saúde	Intervenção	Dose de vitamina A*	Esquema de fortificação	Resultados	Justificativa dos autores	Suplementação de vitamina A
Zlotkin et al. (2003)	Gana (África)	324 crianças de 8-20 meses	- Crianças não anêmicas - Elevada prevalência de def. de zinco, infecções intestinais parasitárias, malária e diarreia	1) <i>Sprinkles</i> (ferro + vit. A) 2) <i>Sprinkles</i> (só ferro) 3) Ferro em gotas 4) Placebo <i>sprinkles</i>	600 µg vita/sachê	Diária/ 6 meses	- Prevalência inicial DVA: 44% - Não foi observado mudança na proporção de crianças com DVA depois da fortificação.	- A fortificação com vitamina A não melhorou a concentração sérica de retinol devido a presença de deficiência de zinco. - DEWEY et al. (2008) → “Estudo de Zlotkin et al. 2003 não teve impacto devido a boa cobertura do programa de suplementação de vit. A durante o estudo.”	Sim (DEWEY et al., 2008) ¹
Suchdev et al. (2012)	Quênia Occidental (África)	862 crianças de 6-35 meses (60 <i>villages</i>)	- População rural - Elevada incidência de malária e desnutrição - Difícil acesso ao serviço de saúde	1) Intervenção (MNP - 14 micronutrientes) 2) Controle (sem intervenção)	375 µg vita/sachê	Diária/ 12 meses	- Diferença absoluta de DVA (RBP) entre GC e GI: GI: - 7,5% GC: + 2,5% p=0.01	- A intervenção foi efetiva devido a baixa cobertura do Programa de Suplementação de vitamina A.	Baixa cobertura da suplementação bianual de vitamina A (22%)
Jack et al. (2012)	Camboja (Sudeste asiático)	1350 crianças de 6 meses (Serviço de saúde)	- População rural - Elevada prevalência de def. de zinco (> 20%) - Bom funcionamento do serviço de saúde	1) MNP (14 micronutrientes) + IYCF education 2) IYCF education	300 µg vita/sachê	Diária/ 6 meses	- Não foi observada diferença entre os grupos em relação a prevalência de DVA.	Não foi observada diferença entre os grupos devido: 1) baixa prevalência de DVA durante todo estudo (3,5%) devido boa cobertura do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A; 2) elevada prevalência de deficiência de zinco.	Sim, com boa cobertura.

Serdula et al. (2013)	República do Quirguistão (Ásia Central)	2008= 571 crianças de 6-24 meses 2010= 541 crianças de 6-24 meses (Serviço de saúde)	- População rural - Bom funcionamento do serviço de saúde	- 2008: antes da implementação do <i>IYCN Program</i> - 2010: depois da implementação do <i>IYCN Program</i> <i>IYCN Program</i> : educação nutricional + MNP (5 micronut)	300 µg vita/sachê	30 sachês em dois meses (administração flexível)	- DVA (RBP) não mudou entre os anos de 2008 e 2010: Total de crianças = 19,5% vs 22,1% (p=0,44) Crianças sem infecção= 12,4% vs 9,8% (p=0,42)	A falta de impacto no estado nutricional de vitamina A pode ser atribuído à: 1) suplementação corrente de vitamina A; 2) insensibilidade do indicador utilizado para avaliar o estado nutricional de vitamina A (RBP); 3) baixa prevalência de DVA nas crianças sem infecção.	Sim
Soofi et al. (2013)	Paquistão (Sul da Ásia)	Crianças de 6 meses de 256 clusters - Grupo A: 947 crianças - Grupo B: 910 crianças - Grupo C: 889 crianças	- População urbana e rural - Presença de serviço de saúde - Elevada prevalência de def. de zinco, desnutrição e baixo peso para idade	1) Grupo A (Grupo controle): educação alimentar e nutricional 2) Grupo B: grupo A + MNP sem zinco 3) Grupo C: grupo A + MNP com zinco (10 mg/dia)	300 µg vita/sachê	Diária /12 meses	Não foi observada diferença significativa na concentração de retinol sérico nos 3 grupos estudados após 12 meses de intervenção.	- A ausência de benefício da fortificação na concentração sérica de retinol pode estar relacionada com as taxas elevadas de suplementação bianual de vitamina A nesta região (> 90%).	Sim, superior a 90%

¹ Dewey KG, Adu-Afarwuah S. Systematic review of the efficacy and effectiveness of complementary feeding interventions in developing countries. *Matern Child Nutr.* 2008;4(suppl 1): 24:85. DVA: deficiência de vitamina A; GC: grupo controle; GI: grupo intervenção; *IYCN Program: Infant & Young Child Nutrition*; MNP: múltiplos micronutrientes em pó; RBP: *retinol binding protein* (proteína transportadora de retinol); * RE/dia

1.3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A anemia e a DVA estão entre os principais problemas de saúde pública no mundo, especialmente nos países menos desenvolvidos (WHO, 2009; WHO, 2015). No Brasil, estima-se que 20,9% e 17,4% das crianças menores de cinco anos apresentavam anemia e DVA, respectivamente (BRASIL, 2009).

As intervenções para prevenir e controlar esses problemas em nível de saúde pública incluem a promoção do aleitamento materno exclusivo até o sexto mês de vida, diversificação alimentar para aumentar o consumo de vitaminas e minerais pela alimentação, fortificação de alimentos e da alimentação complementar e suplementação (BHUTTA et al., 2008). O Brasil, apesar de contar com essas intervenções para prevenir e controlar a anemia e a DVA na infância, pouco tem avançado na redução desses distúrbios no país.

Especificamente para a prevenção da DVA, uma das estratégias adotadas pelo governo brasileiro é a suplementação com megadoses de vitamina A para crianças de seis a 59 meses de idade residentes em todo território nacional (BRASIL, 2013b). No entanto, evidências recentes têm apontado que essa suplementação é pouco efetiva na redução dessa deficiência (MASON et al., 2015), sendo recomendada pela OMS para a redução da morbidade e mortalidade infantil (WHO, 2011c). Outra estratégia adotada no país para a prevenção dessa deficiência nutricional é a EAN, mas considerando a elevada demanda de vitamina A por crianças menores de dois anos, muitas vezes não supridas pela alimentação (DEWEY, 2013), somente as ações de EAN podem não ser suficientes para reduzir essa deficiência na população brasileira, sendo necessárias outras estratégias complementares que aumentem a ingestão desta vitamina, de modo frequente e em doses fisiológicas (MASON et al., 2015).

A fortificação dos alimentos com vitamina A é uma estratégia recomendada pela OMS para melhoria do estado nutricional dessa vitamina, porém não é adotada no Brasil pela falta de dados epidemiológicos que justifiquem a utilização dessa estratégia para a prevenção de DVA na população brasileira (BRASIL, 2007). Além disso, o consumo de alimentos industrializados, que são os alimentos comumente

fortificados, não é uma abordagem incentivada pelo governo brasileiro (BRASIL, 2014).

Neste contexto, a fortificação da alimentação complementar com MNP se apresenta como uma estratégia interessante para a prevenção da DVA por aumentar a ingestão de vitamina A de crianças de modo frequente e em doses fisiológicas. Além disso, pelo fato de ser adicionado diretamente na alimentação da criança, oferece uma oportunidade para a promoção da alimentação complementar saudável, que pode influenciar diretamente no estado nutricional geral desses indivíduos.

Diante de evidências de estudos realizados na África e Ásia em que a fortificação com MNP reduziu a prevalência de DVA em uma região com baixa cobertura do programa de suplementação de vitamina A (SUCHDEV et al., 2012), porém não trouxe benefícios em cenários com ampla distribuição desses suplementos (ZLOTKIN et al., 2003; JACK et al., 2012; SERDULA et al., 2013; SOOFI et al., 2013), estudos que avaliem a efetividade dessa fortificação na nossa população, que apresenta um contexto mais favorável, uma cobertura vacinal quase universal, e um programa de suplementação de vitamina A em expansão, são necessários.

Com relação à prevenção da anemia, conhecer os fatores associados a essa condição em crianças atendidas em unidades básicas de saúde, assim como o estado nutricional de micronutrientes importantes na eritropoiese, como o folato e a vitamina B12, são importantes para a avaliação e reformulação das estratégias já implantadas e proposição de novas formas de intervenção a fim de reduzir esse distúrbio no país.

1.4 HIPÓTESE CENTRAL DA INVESTIGAÇÃO

A fortificação da alimentação complementar com múltiplos micronutrientes em pó é efetiva na prevenção da deficiência de vitamina A em crianças assistidas na atenção básica à saúde.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o impacto da fortificação caseira com MNP no estado nutricional de vitamina A de crianças participantes do ENFAC (Artigo 1);
- Avaliar a prevalência de anemia e seus fatores associados em crianças participantes do grupo controle do ENFAC (Artigo 2);
- Avaliar o estado nutricional de folato e de vitamina B12 e efeito combinado dessas vitaminas no risco para anemia em crianças participantes do grupo controle do ENFAC (Artigo 3).

3 MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DO ESTUDO

O Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar (ENFAC) é um estudo multicêntrico que tem por objetivo avaliar o impacto da fortificação da alimentação complementar com múltiplos micronutrientes em pó (MNP) na anemia e deficiência de micronutrientes em crianças atendidas na Atenção Básica à Saúde (ABS) de quatro cidades brasileiras (Goiânia, Olinda, Rio Branco e Porto Alegre) (Figura 3). O delineamento do estudo é do tipo ensaio clínico pragmático controlado com crianças atendidas em Unidades Básicas de Saúde (UBS) dessas quatro cidades.

Figura 3 - Cidades participantes do Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar (ENFAC).

Goiânia, capital do estado de Goiás, localiza-se na região Centro-Oeste do país, possuía uma população de 1.302.001 habitantes em 2010 e um Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) de 0,799. Olinda, município da Região Metropolitana de Recife do estado de Pernambuco, localiza-se na região Nordeste do país, com uma população de 377.779 habitantes em 2010 e um IDHM de 0,735. Porto Alegre, capital do Estado do Rio Grande do Sul, possuía 1.409.351 habitantes em 2010 e IDHM de 0,805, e Rio Branco, capital do estado do Acre,

localiza-se na região Norte do Brasil, possuía 336.038 habitantes em 2010 e um IDHM de 0,727 (BRASIL, 2017b).

Em 2012, no início do estudo, a cobertura populacional estimada da ABS nos municípios participantes do ENFAC era de 63,8% em Goiânia, 47,4% em Olinda, 70,5% em Rio Branco e 52,8% em Porto Alegre. Este indicador se dá pelo percentual da população coberta tanto pelas equipes da Estratégia Saúde da Família quanto por equipes de ABS tradicional (BRASIL, 2017c). Neste mesmo ano, o Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A estava vigente em duas cidades participantes do estudo (Rio Branco e Olinda) e a suplementação com megadoses de vitamina A de crianças e puérperas aconteceu durante todo o período da coleta de dados, uma vez que era realizada, em sua maioria, durante a rotina do serviço (BRASIL, 2017d).

Para compor a população do estudo, inicialmente, foram selecionadas em cada cidade participante UBS com maior número de crianças menores de um ano cadastradas no serviço. Em Goiânia e Porto Alegre foram selecionadas UBS do modelo de atenção tradicional à saúde, sendo cinco UBS em Goiânia e quatro UBS em Porto Alegre. Em Olinda, foram selecionadas nove UBS da Estratégia Saúde da Família e em Rio Branco foram selecionadas seis UBS dos dois modelos de atenção à saúde. Ao todo, fizeram parte deste estudo 24 UBS.

A população do estudo foi composta por crianças atendidas nessas UBS. O grupo controle (GC) foi composto por crianças de 10 a 14 meses de idade e o grupo intervenção (GI) incluiu crianças com idade entre seis e oito meses que atenderam os critérios de inclusão e exclusão do ENFAC.

Os critérios de inclusão foram a aprovação dos pais ou responsáveis para participar do estudo e não estar em tratamento para anemia no momento inicial da pesquisa. Os critérios de exclusão incluíram crianças prematuras (<37 semanas de gestação, conferido na caderneta de saúde da criança); nascidas de parto gemelar; com malária, portadoras de HIV, tuberculose ou hemoglobinopatias; e as que estavam com febre ($>39^{\circ}\text{C}$) no dia da coleta de sangue.

Para o cálculo do tamanho amostral foi considerado como desfecho principal do estudo a diferença entre as médias de hemoglobina sanguínea. Para um poder do teste de 95% e nível de significância de 5% (bicaudal), 105 crianças em cada cidade

e grupo de estudo foram necessárias para detectar uma diferença de 6 g/L entre as médias de hemoglobina, estimando-se desvio-padrão de 12 g/L. Com acréscimo de 30% para cobrir eventuais recusas e perdas de seguimento, o tamanho amostral foi de 135 crianças em cada grupo experimental e cidade, totalizando 1080 crianças (HULLEY et al., 2001).

3.2 COLETA DE DADOS

A coleta de dados do ENFAC ocorreu entre junho de 2012 e junho de 2013. Em cada centro do estudo, equipes de trabalho de campo foram treinadas e alocadas em cada uma das UBS participantes para realizar a inscrição das crianças na pesquisa. Inicialmente, um questionário de triagem foi aplicado para verificar a elegibilidade da criança e alocação em um dos grupos, controle ou intervenção (Anexo 3).

3.2.1 Grupo Controle

Para compor o GC, no início do estudo, pais ou responsáveis por crianças de 10 a 14 meses de idade elegíveis para o estudo e atendidas na rotina tradicional de puericultura, na sala de vacina ou captadas durante visitas domiciliares foram convidados a participar da pesquisa. Após aceite e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexo 4), entrevistadores aplicaram um questionário estruturado com os responsáveis pela criança contendo os seguintes tópicos: condições socioeconômicas, demográficas, maternas e familiares, morbidades, alimentação e nutrição da criança (Anexo 5).

Após a aplicação do questionário, medidas antropométricas das crianças foram aferidas por pesquisadores treinados e foram agendados horários para a coleta de sangue para um período de até uma semana após a entrevista (Figura 4).

Figura 4 – Delineamento do estudo em cada um das quatro cidades participantes.

3.2.2 Grupo Intervenção

Recrutamento e intervenção

Pais ou responsáveis por crianças com idade entre seis e oito meses, atendidas nas mesmas UBS do GC, também foram convidados, no início do estudo, para participar da pesquisa e receber a intervenção com MNP. Após aceite e assinatura do TCLE (Anexo 4), um questionário inicial foi utilizado para obter informações sobre condições socioeconômicas, demográficas, maternas e familiares, morbidades, alimentação e nutrição da criança (Anexo 6).

Antes do início do estudo, a equipe de pesquisa realizou treinamento com os profissionais de saúde das UBS participantes a fim de capacitá-los para a prescrição da intervenção com os MNP. Essas capacitações tiveram duração de 1 hora e nelas foram utilizados materiais educativos elaborados pela própria equipe de pesquisa para ajudar no desenvolvimento da intervenção. Buscou-se também integrar esta estratégia às outras ações de alimentação e nutrição realizadas na ABS, principalmente no que tange a promoção do aleitamento materno e promoção da alimentação complementar saudável.

Sendo assim, previamente capacitados, os médicos e enfermeiros das UBS participantes do ENFAC foram orientados a prescrever, para todas as crianças de seis

a oito meses de idade atendidas no serviço, 60 sachês contendo múltiplos micronutrientes na forma de pó que deveriam ser adicionados na alimentação complementar da criança, uma vez ao dia, por um período de até três meses. O sachê deveria ser adicionado aos alimentos semissólidos prontos para o consumo, tais como papas/purês de frutas, legumes ou no arroz e feijão, diretamente no prato da criança, na hora de servir. O sachê não deveria ser adicionado em líquidos e/ou alimentos duros e, para garantir o aproveitamento adequado dos micronutrientes, o alimento com o sachê deveria ser oferecido à criança no prazo máximo de 1 hora e não deveria ser reaquecido, pois temperaturas acima de 60°C podem derreter a camada lipídica que envolve o ferro alterando a cor e cheiro dos alimentos (WHO, 2011d; THE MICRONUTRIENT INITIATIVE, 2011).

Juntamente com a prescrição dos sachês de micronutrientes, os profissionais de saúde deveriam orientar os pais e responsáveis pelas crianças quanto às práticas saudáveis de aleitamento materno e alimentação complementar (BRASIL, 2010) e orientá-los a retornar a UBS para acompanhamento conforme a rotina do serviço.

Durante todo o estudo, os profissionais foram orientados a proceder o acompanhamento das crianças do GI de acordo com as normas e condutas de tratamento de enfermidades, incluindo as nutricionais, previstas no plano de ações do município, em conformidade com as orientações do Ministério da Saúde. A equipe de pesquisa prestou apoio técnico aos profissionais de saúde a fim de ajudá-los a desenvolver a intervenção com MNP e todas as intercorrências durante este período foram documentadas pela equipe de pesquisa e levadas em consideração na análise dos resultados da intervenção.

A formulação do sachê utilizada no estudo, abaixo descrita, segue a composição recomendada pelo *Home Fortification Technical Advisory Group* para crianças de seis a 23 meses de idade (HFTAG, 2013). Os sachês contêm 15 micronutrientes, entre eles o ferro, vitamina A e zinco, conforme recomendação da OMS (WHO, 2016a). Essa formulação é adotada pela UNICEF e atualmente recomendada para estudos de intervenção (Quadro 1).

Quadro 1 – Composição nutricional do sachê utilizado no Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar (ENFAC).

Micronutriente	Quantidade
Ferro	10 mg
Zinco	4,1 mg
Ácido fólico	150 µg
Vitamina A	400 µg RE
Vitamina C	30 mg
Vitamina D3	5 µg
Vitamina E	5 mg TE
Vitamina B1	0,5 mg
Vitamina B2	0,5 mg
Vitamina B6	0,5 mg
Vitamina B12	0,9 µg
Niacina	6 mg
Cobre	0,56 mg
Iodo	90 µg
Selênio	17 µg

Fonte: Sachê Mix Me, produzido pela DSM Nutritional Products Europe Ltd.

Seguimento (três meses após início da intervenção)

As crianças do GI foram avaliadas pela equipe da pesquisa com três meses e seis meses após o início da intervenção. Após três meses do início da intervenção, os pais e/ou responsáveis pelas crianças responderam a um questionário sobre a aceitação e adesão ao uso do sachê com MNP e sobre possíveis efeitos colaterais associados ao produto (Anexo 7).

Avaliação final (quatro a seis meses após intervenção)

Após quatro a seis meses do início da intervenção, as crianças do GI, que neste momento apresentavam a mesma idade das crianças do GC, foram avaliadas quanto à efetividade da suplementação com vitaminas e minerais. Para fins de comparação com os dados do GC, foi utilizado o mesmo questionário sobre condições socioeconômicas, demográficas, maternas e familiares, morbidades, alimentação e

nutrição da criança (Anexo 8). Neste momento, também foram coletadas informações adicionais sobre a adesão à intervenção. A quantidade de sachês restantes de cada participante no final da pesquisa foi verificada pelos pesquisadores de campo pela contagem dos sachês não utilizados.

Assim como no GC, medidas antropométricas das crianças foram aferidas por pesquisadores treinados e a coleta de sangue foi agendada para até uma semana após a entrevista conforme preferência do responsável pela criança.

3.3 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Medidas de peso e altura foram realizadas em duplicatas e de modo sequencial utilizando procedimentos padronizados (LOHMAN et al., 1988). O valor médio das duas medições foi considerado para análise.

Para medida de peso, foram utilizadas balanças eletrônicas da marca Tanita com capacidade de 150 kg e sensibilidade de 100g. A medida do peso foi obtida com a criança no colo da mãe e, posteriormente, descontado o peso da mãe. Esse procedimento foi escolhido para uma melhor padronização entre os centros do estudo, uma vez que a conferência e padronização das balanças pediátricas disponíveis nas UBS seria inviável, e porque a avaliação antropométrica era também realizada na residência da criança, impossibilitando assim, a utilização da balança pediátrica.

O comprimento foi avaliado por meio de infantômetro portátil da marca Sanny, com extensão de um metro e precisão de 1 mm. As crianças foram medidas em decúbito dorsal em superfície lisa e o valor registrado em centímetros.

Para avaliação do estado nutricional, foram utilizados os índices comprimento por idade e índice de massa corporal por idade expressos em escore-z, adotando-se como referência as curvas de crescimento da OMS (WHO, 2006). Com a utilização do programa WHO Anthro, valores iguais ou inferiores a -2 escores-z foram classificados como déficit nos índices avaliados.

3.4 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

A coleta de sangue foi realizada na UBS ou no laboratório, de acordo com a disponibilidade do local e preferência do responsável pela criança, em data previamente agendada (Anexo 9). Técnicos devidamente treinados e com experiência na coleta de sangue de crianças auxiliaram na realização desse procedimento. Foram coletadas amostras de até 10 mL de sangue venoso das crianças, no início da manhã, com jejum mínimo de três horas. As crianças com febre (temperatura acima de 37,5°C) no dia da coleta do sangue foram reagendadas para uma nova data.

O volume de sangue coletado foi distribuído em dois tubos de ensaio: a) tubo seco para obtenção do soro, envolto por papel alumínio para proteção da luz e mantido em temperatura ambiente em caixa de isopor para centrifugação em até uma hora após a coleta; b) tubo com EDTA para obtenção do plasma, mantido em caixa de isopor com gelo até centrifugação. No laboratório, o sangue foi centrifugado a 3000 rotações por minuto e as amostras de sangue foram congeladas a -20°C até o envio para o Laboratório de Nutrição Humana do Departamento de Nutrição (FSP/USP), em São Paulo. O envio das amostras foi realizado via transporte aéreo, em caixa de isopor, com gelo seco. Em São Paulo, as amostras foram armazenadas a -70°C até a realização das análises bioquímicas, realizadas dentro de quatro a seis meses após a coleta.

A determinação de hemoglobina sanguínea foi realizada no dia da coleta de sangue nos quatro centros colaboradores por hemoglobinômetro portátil da marca Hemocue. A determinação plasmática de ferritina e do receptor de transferrina foram realizadas utilizando *kits* pela técnica de imunoensaio enzimático (ELISA) (Ramco, Houston, Texas, EUA) e as análises das concentrações séricas de retinol, β -caroteno e vitamina 25(OH) foram realizadas por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (HPLC-110, Hewlett-Packard, Estados Unidos). A determinação do folato e da vitamina B12 foram realizadas por técnica de fluoroimunoensaio (*kits* Perkin Elmer, Wallac Oy, Turku, Finland) e a alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) e a proteína C-reativa (PCR) foram determinadas utilizando-se método imunoquímico automático "IMAGE" (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA).

Para a definição de anemia foi adotado como ponto de corte a concentração de hemoglobina <110 g/L, conforme estabelecido pela OMS para crianças de seis meses a cinco anos de idade (WHO, 2011e). Para classificação de deficiência de ferro (DF) considerou-se a concentração de ferritina <12 µg/L e/ou receptor solúvel de transferrina >8,3 mg/L. A anemia por deficiência de ferro foi definida quando a DF ocorreu em crianças anêmicas (WHO, 2001). Crianças com concentração sérica de retinol inferior a 1,05 µmol/L e 0,7 µmol/L foram consideradas com insuficiência e deficiência de vitamina A, respectivamente (WHO, 1996). A deficiência de folato foi definida como concentrações séricas de folato <10 nmol/L (WHO, 2008) e o estado nutricional de vitamina B12 foi definido como: normal (>221 pmol/l), marginal (148–221 pmol/l) e baixo (<148 pmol/l) (GREEN et al., 2011). Valores de PCR >5 mg/L e/ou alfa-glicoproteína (AGP) >1 g/L foram considerados como inflamação e/ou infecção aguda ou crônica, conforme descrito em metanálise conduzida por THURNHAM et al. (2010).

3.5 CASUÍSTICA PARA ANÁLISE

A casuística apresentada nesta seção se refere ao estudo principal (ENFAC). Para cada artigo apresentado na seção Resultados e Discussão desta tese, uma casuística diferente foi utilizada de acordo com os objetivos do artigo e disponibilidade dos dados bioquímicos. A descrição da casuística utilizada em cada investigação é apresentada na página introdutória de cada artigo (na seção dos Resultados e Discussão), assim como na seção dos métodos de cada artigo.

Para o estudo principal, 1225 crianças foram avaliadas quanto à elegibilidade do estudo no período de junho de 2012 a dezembro de 2012. Deste total, 1213 eram elegíveis (12 crianças foram excluídas por serem prematuras). Baseado na idade das crianças, 543 foram selecionadas para compor o GC por apresentarem idade entre 10 e 14 meses. Destas, 22 pais (4%) se recusaram a participar do estudo, resultando num total de 521 crianças (96% das elegíveis). Entre as 670 crianças com idade entre seis e oito meses (elegíveis para o GI), os pais de 106 (15,8%) recusaram participar do estudo, resultando em um total de 564 crianças selecionadas para receber a

intervenção com MNP. Dessas crianças, 24 (4,3%) não pegaram o sachê nas UBS e 78 (13,8%) foram perdidas durante o seguimento, resultando em 462 crianças (81,9% dentre as que concordaram em participar) incluídas nas análises do GI. O fluxograma do processo de amostragem está apresentado na Figura 5.

Figura 5 – Fluxograma do processo de amostragem do Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar (ENFAC).

3.6 DESFECHOS DE INTERESSE E VARIÁVEIS DE EXPOSIÇÃO

3.6.1 Avaliação do impacto da fortificação caseira com MNP no estado nutricional de vitamina A: Artigo 1

Para a investigação principal desta tese, considerou-se como desfecho principal a diferença na prevalência de DVA entre os grupos controle e intervenção. Como variáveis de exposição foram consideradas as características da criança (sexo, peso ao nascer e cor da pele); características maternas (idade e escolaridade); uso de suplementos de vitaminas A e D pela criança; presença de anemia, DF e inflamação; e as concentrações séricas de beta-caroteno. As variáveis de exposição referentes às características da criança e maternas, assim como o uso de suplementos, que se

diferenciaram entre os grupos do estudo foram consideradas como ajuste nas análises estatísticas.

3.6.2 Análise dos fatores associados à anemia nas crianças do grupo controle do ENFAC: Artigo 2

Para a investigação dos fatores associados à anemia nas crianças do GC do ENFAC (artigo 2 da presente tese), foi considerada como variável dependente a presença de anemia. Para a seleção das variáveis independentes foi utilizado um modelo teórico hierarquizado, com três níveis de determinação, conforme proposto por Cardoso et al. (2012) (Figura 6).

Adaptado de CARDOSO et al. (2012).

Figura 6 – Modelo teórico sobre determinação da anemia nas crianças do grupo controle do Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar.

O nível mais distal incluiu as características socioeconômicas, demográficas e ambientais; o nível intermediário as variáveis de nascimento, práticas alimentares e o uso de suplementos; e o nível proximal incluiu as variáveis antropométricas, de morbidade relatada e os indicadores bioquímicos (Figura 6).

3.6.3 Análise do estado nutricional de folato e vitamina B12 nas crianças do grupo controle do ENFAC: Artigo 3

O estado nutricional de folato e vitamina B12 e o efeito combinado dessas vitaminas no risco para anemia nas crianças do GC do ENFAC foi avaliado no artigo 3, presente na seção de Resultados e discussão desta tese. Além disso, os fatores associados às altas concentrações de folato e baixas concentrações de vitamina B12 também foram investigados nesse trabalho.

Na investigação do efeito combinado do estado nutricional de folato e da vitamina B12, a variável dependente foi a anemia. Em relação a investigação dos fatores associados às altas concentrações de folato, o principal desfecho de interesse foi as altas concentrações de folato sérico, cujo ponto de corte foi o menor valor do terceiro tercil de folato, e as variáveis explanatórias contemplaram as mesmas variáveis utilizadas no artigo 2 da presente tese.

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram digitados seguindo o procedimento de dupla entrada no *software* Epi Info 5.3.1 para *Windows*. Para a edição e análises estatísticas, os dados foram transportados para o programa estatístico Stata versão 12.0.

Para cada artigo apresentado nesta tese foram empregados métodos estatísticos específicos que estão detalhados e oportunamente referenciados na descrição dos métodos dos respectivos artigos, presentes na seção de Resultados e Discussão desta tese.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS

O ENFAC foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, com o protocolo de nº 2291/2013 (Anexo 10). Este estudo está registrado na Rede Brasileira de Ensaios Clínicos sob nº RBR-5ktv6b.

Todos os entrevistadores da pesquisa se identificaram, explicaram os objetivos, riscos e benefícios da pesquisa e solicitaram consentimento esclarecido aos pais ou responsável pela criança por meio da assinatura do TCLE (Anexo 4). Foi assegurado pela equipe de pesquisa o sigilo das informações obtidas e a possibilidade de recusar a participação a qualquer momento sem nenhum prejuízo.

Os resultados laboratoriais individuais foram fornecidos diretamente aos cuidadores ou aos agentes comunitários de saúde para posterior acompanhamento e tratamento quando necessário pelas equipes de saúde das UBS. As crianças com diagnóstico de anemia, DF ou DVA foram encaminhadas para tratamento pela equipe de profissionais da UBS.

Por questões éticas, não foi possível obter amostras sanguíneas do GI antes da intervenção, porém ambos os grupos de estudo puderam ser comparados quando as crianças do GI estavam com idade semelhante às crianças do GC.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presente tese de doutorado é composta por três artigos científicos originais. O primeiro deles apresenta os principais resultados desta tese e foi publicado em 2016 pelo periódico *Maternal and Child Nutrition*. Os demais artigos apresentam dados de investigações complementares, onde foram considerados os dados das crianças do grupo controle do ENFAC. O primeiro deles foi submetido para consideração no periódico *Plos One* e o segundo está em processo de finalização para posterior submissão ao periódico *Public Health Nutrition*.

As referências dos artigos seguem abaixo:

- 1) Silva LLS, Augusto RA, Tietzmann DC, Sequeira LAS, Hadler MCCM, Muniz PT, de Lira PIC, Cardoso MA and for the ENFAC Working Group. The impact of home fortification with multiple micronutrient powder on vitamin A status in young children: A multicenter pragmatic controlled trial in Brazil. *Matern Child Nutr*. 2017; 13(4). doi: 10.1111/mcn.12403.
- 2) Silva LLS, Fawzi WW, Cardoso MA, ENFAC Working Group. Factors associated with anemia in young children in Brazil. *PloS One*. 2017. (submetido para publicação).
- 3) Silva LLS, Fawzi WW, Cardoso MA, ENFAC Working Group. Serum folate and vitamin B12 status in young Brazilian children. 2017.

4.1 ARTIGO 1

The impact of home fortification with multiple micronutrient powder on vitamin A status in young children: A multicenter pragmatic controlled trial in Brazil

(Artigo original publicado)

O principal objetivo deste artigo foi avaliar a efetividade da fortificação caseira com MNP no estado nutricional de vitamina A de crianças atendidas em UBS de quatro cidades brasileiras. Para esta investigação, foram considerados os dados das crianças dos grupos controle e intervenção do ENFAC, com dados disponíveis de retinol sérico.

Com o intuito de minimizar as diferenças etárias entre os grupos de estudo, foi considerado somente os dados das crianças com idade entre 11 e 14 meses. Sendo assim, participaram deste estudo 395 crianças do GC e 399 crianças do GI.

Nas análises estatísticas, foi utilizada a análise por intenção de tratar, comparando-se o desfecho principal dessa investigação, DVA, entre os grupos controle e intervenção, independente da adesão dos cuidadores ao uso do sachê com MNP.

Como principal achado, este artigo identificou que a fortificação caseira com vitaminas e minerais na forma de pó reduziu em 55% a prevalência de DVA em crianças atendidas na ABS de quatro cidades brasileiras. Este estudo também apontou que esta intervenção foi efetiva em locais com ou sem a suplementação com megadoses de vitamina A. Este resultado é interessante pois traz evidências que esta estratégia pode ser uma boa alternativa para reforçar o conjunto de ações de prevenção e controle da DVA na infância e é uma excelente oportunidade para promover a alimentação complementar adequada e saudável nesse ciclo da vida.

ORIGINAL ARTICLE

The impact of home fortification with multiple micronutrient powder on vitamin A status in young children: A multicenter pragmatic controlled trial in Brazil

Lara Livia Santos Silva¹ | Rosângela Aparecida Augusto¹ | Daniela Cardoso Tietzmann² | Leopoldina Augusta Souza Sequeira³ | Maria Claret Costa Monteiro Hadler⁴ | Pascoal Torres Muniz⁵ | Pedro Israel Cabral de Lira³ | Marly Augusto Cardoso¹ | for the ENFAC Working Group^a

¹Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Nutrition, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

³Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

⁴School of Nutrition, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

⁵Department of Health Sciences, Federal University of Acre, Rio Branco, Brazil

Correspondence

Marly Augusto Cardoso, Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo 715, São Paulo, São Paulo 01246-904, Brazil.
Email: marlyac@usp.br

Funding information

CNPq, Grant/Award Number: 552747/2011-4; 200487/2015-9.

^a Please see Appendix.

Abstract

Home fortification with multiple micronutrient powder (MNP) is effective in the prevention of anemia in young children. However, the impact on their vitamin A status remains controversial. This study aimed to evaluate the effect of MNP on vitamin A status in young Brazilian children. A multicenter pragmatic, controlled trial was carried out in primary health centers in four Brazilian cities. In the beginning of the study, the control group (CG) consisted of children 11–14 months old ($n = 395$) attending in routine pediatric health care. In parallel, the intervention group (IG) was composed of children 6–8 months old ($n = 399$), in the same health centers, who followed the intervention with MNP for 2–3 months. The analysis of the effect of MNP on vitamin A status was performed by comparing the IG with the CG after a 4- to 6-month follow-up when IG children had reached the age of the controls. The prevalence of vitamin A deficiency (VAD; serum retinol $<0.70 \mu\text{mol/L}$) in the CG was 16.2%, while in the IG was 7.5%—a 55% reduction in the VAD [prevalence ratio (95% confidence interval) = 0.45 (0.28; 0.72)]. This reduction was also significant when stratifying the study centers by coverage of the Brazilian Vitamin A Supplementation Program. The adjusted mean of vitamin A serum concentrations improved in the IG compared with CG children, with a shift to the right in the vitamin A distribution. Home fortification with MNP was effective in reducing VAD among young Brazilian children.

KEYWORDS

home fortification, micronutrients, multiple micronutrient powder, primary health care, vitamin A, young children

1 | INTRODUCTION

Vitamin A deficiency (VAD) affects approximately 190 million pre-school children around the world, which corresponds to 33.3% of this segment of the population (World Health Organization, WHO, 2009). Although this deficiency has decreased over the last few decades, it remains prevalent in some places such as South Asia and sub-Saharan Africa (Stevens et al., 2015).

In Brazil, according to the latest National Demographic and Health Survey conducted in 2006, 17.4% of children under 5 years of age were diagnosed with VAD (Brasil, Ministério da Saúde, 2009), which

represents a moderate public health problem in this country (World Health Organization, WHO, 2011a). Currently, Brazil has adopted vitamin A supplementation in children under 5 years old as the main strategy for prevention and control of VAD at a population level (Brasil, Ministério da Saúde, & United Nations Children's Fund, UNICEF, 2007; Brasil, Ministério da Saúde, 2013). The supplementation occurs through the National Vitamin A Supplementation Program, created in 1983, which distributes capsules of high doses of vitamin A for children aged 6–59 months twice each year. Initially, the program was implemented in the most prevalent regions of VAD (northeast and southeast regions); however, since 2012, this strategy is in the process

of expanding to all regions of the country (Brasil, Ministério da Saúde, 2013), despite the current international discussion about re-assessing the value of universal coverage of vitamin A supplementation (Thorne-Lyman & Fawzi, 2011; Mason, Greiner, Shrimpton, Sanders, & Yukich, 2015; Kapil & Sachdev, 2013). Regarding the fortification of staple foods with vitamin A, the Ministry of Health of Brazil did not adopt this strategy as a public health action due to the lack of epidemiological data to support the universal food fortification for controlling VAD in the country (Brasil, Ministério da Saúde, & United Nations Children's Fund, UNICEF, 2007).

In 2011, the WHO suggested the use of micronutrient powder (MNP) to increase the intake of vitamins and minerals in complementary feeding in settings where the prevalence of anemia in children under 5 years old is 20% or higher (World Health Organization, WHO, 2011b). Current evidence suggests that this strategy is effective in reducing anemia and iron deficiency in children 6–23 months of age (De-Regil, Suchdev, Vist, Walleaser, & Peña-Rosas, 2013; De-Regil, Suchdev, Vist, Walleaser, & Peña-Rosas, 2011); however, there are few studies that assess the impact of MNP on the nutritional status of vitamin A (De-Regil et al., 2011). These studies are contradictory in the findings and differ concerning the duration of intervention, prevalence of nutritional disorders in the population studied, and the coverage of vitamin A supplementation (Zlotkin, Antwi, Schauer, & Yeung, 2003; Suchdev et al., 2012; Serdula et al., 2013; Jack et al., 2012; Soofi et al., 2013).

In this scenario, where vitamin A policies are being re-evaluated, new approaches to reduce this deficiency in childhood need to be assessed. To contribute to this discussion, we aimed to assess the effect of home fortification with MNP on vitamin A nutritional status among young Brazilian children.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Study design and population

The *Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar* (ENFAC), a pragmatic, controlled clinical trial, was conducted between June 2012 and June 2013 in Brazil. Study design details have been previously reported (Cardoso et al., 2016). Briefly, the ENFAC study was primarily designed to assess the impact of MNP among infants who attended to 24 large primary health centers in four cities (Rio Branco, Olinda, Goiânia, and Porto Alegre) from

different regions in Brazil. Two of the four selected cities (Rio Branco and Olinda) were covered by the National Vitamin A Supplementation Program during data collection (Brasil, Ministério da Saúde, 2016). In these cities, the supplementation of high doses of vitamin A took place during the entire data collection because it occurs as part of routine pediatric care.

The study population consisted of young children who attended at these health centers. In the beginning of the study, the control group (CG) was composed of children aged 11–14 months seen during routine pediatric care. At the same time, children aged 6–8 months were enrolled through the same health centers to receive home fortification with MNP given once a day in complementary feeding for 60 days (intervention group [IG]), according to the WHO guidelines (World Health Organization, WHO, 2011b). For this pragmatic trial, we did not collect blood samples from the IG children before the intervention because of ethical concerns for blood collection from 6- to 8-month infants in the routine primary health care. The IG was assessed 6 months later when the children reached the age of the CG children at enrolment.

The eligibility criteria of the main study were parental approval to participate in the study and not currently receiving treatment for anemia. The exclusion criteria included premature birth (<37 weeks' gestation); twins; reported cases of HIV infection, malaria, tuberculosis, or genetic hemoglobin disorders; and fever (>39 °C) on the day of blood sampling.

The sample size was calculated for the main study. At least 105 children in each city and study group were necessary to detect differences in hemoglobin concentrations between IG and CG groups. Considering an additional of 20% to cover for possible losses and refusals, about 1,000 children were expected in total to allow the detection of difference in the prevalence of VAD between CG and IG, with 95% power and .05 significance level (Hulley et al., 2001). This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures involving human subjects were approved by the Human Ethical Review Board of the School of Public Health of the University of São Paulo. Written informed consent was obtained from each child's caregiver. This study was registered at [www.ensaiosclinicos.gov.br](http://www ensaiosclinicos.gov.br) as RBR-5ktv6b.

2.2 | Data collection

In the beginning of the study, caregivers of the CG children were invited to participate in this study. During the enrolment of the CG

Key messages

- Vitamin A deficiency remains the leading cause of preventable blindness in preschool children around the world. New approaches to reduce vitamin A deficiency in childhood are necessary.
- Home fortification with multiple micronutrient powder is effective in the prevention and control of anemia and iron deficiency in young children; however, the impact on their vitamin A status remains controversial.
- Our study shows that home fortification with multiple micronutrient powder decreases the prevalence of vitamin A deficiency and improves the vitamin A status in young Brazilian children independent of vitamin A supplementation program.

group, a questionnaire was administered by trained fieldworkers through a face-to-face interview with the children's caregivers, with the following topics: demographic characteristics (child's sex, age, and skin color classified as White, Black, or *Pardo* [as used in Brazilian census for individuals of European, African, and Amerindian ancestry]); maternal education and age; and child's birth weight. After enrolment, the fieldworkers scheduled the date of blood collection of the children up to a week after the interview.

The IG children were enrolled at the same time as the GC, at 6–8 months of age, to receive the intervention with MNP by healthcare workers. Before the beginning of the study, the research team provided technical assistance to health workers, with materials to help develop the MNP intervention and to integrate it into the existing Brazilian Nutrition Program. The healthcare workers were able to prescribe to all children aged 6–8 months 60 sachets of MNP (MixMe™, DSM Nutritional Products Europe, Ltd.), which contained 10 mg iron; 400 µg vitamin A; 5 µg vitamin D₃; 5 mg vitamin E; 0.5 mg each of vitamins B₁, B₂, and B₆; 150 µg folic acid; 6 mg niacin; 0.9 µg vitamin B₁₂; 30 mg vitamin C; 4.1 mg zinc; 17 µg selenium; 0.56 mg copper; and 90 µg iodine. These sachets are needed to be offered to children once a day in complementary feeding over a period of 2–3 months. The mothers or caretakers were counseled to add these sachets to semi-solid food before serving, avoiding heating the food containing the MNP complex (World Health Organization, WHO, 2011b). Along with prescription of the sachet of micronutrients, caregivers were instructed by health professionals about health practices of breastfeeding and complementary feeding as a part of routine pediatric care.

Four to six months after the enrolment of the IG children, fieldworkers applied the same questionnaire that was administered for the CG children, with additional information about the consumption of MNP. The quantity of leftover sachets from each participant at the end of the trial was checked by the fieldworkers by counting the unused sachets. As for the CG, blood collection was scheduled up to a week after the interview in accordance with the child's caregiver's preference.

2.3 | Biochemical assays

A fasting (≥3 hr) venous blood sample was collected by trained technicians in the morning and kept on ice until centrifugation. Serum (protected from light and centrifuged within 1 hr of collection) and plasma samples were frozen at –20 °C before being shipped to São Paulo on dry ice and maintained at –70°C until further analysis.

The determination of blood hemoglobin was conducted at the field laboratory in each of four cities by portable hemoglobinometers (Hb301; HemoCue®, Angelholm, Sweden). In São Paulo, serum concentrations of retinol and beta-carotene were measured using HPLC methods (HP-1100 HPLC system, Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA) as previously described (Gomes et al., 2004), and the quantification of serum ferritin and transferrin receptor was performed using commercially available enzyme immunoassays (Ramco Laboratories, USA). C-reactive protein (CRP) and alpha-1-acid glycoprotein (AGP) were determined using an IMMAGE Immunochemistry System

(Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The laboratory assayed internal and external blinded quality control specimens in each run. Based on the control specimens, the accuracy and inter-assay coefficients of variation for these analyses were within 7%, as described elsewhere (Cardoso et al., 2016).

Anemia was defined as a hemoglobin concentration <110 g/L as established by the WHO (World Health Organization, WHO, 2011c). Children with serum retinol concentrations <0.70 µmol/L were considered as having VAD (World Health Organization, WHO, 1996). Iron deficiency was defined as ferritin concentrations <12 µg/L and/or transferrin receptor concentrations >8.3 mg/L (World Health Organization, WHO, 2001). Concentrations of CRP >5 mg/L and AGP > 1 g/L were measured as acute and chronic inflammation (Thurnham, McCabe, Northrop-Clewes, & Nestel, 2003), respectively.

2.4 | Statistical analysis

In this study, we used intent-to-treat analysis to evaluate the impact of home fortification with MNP on vitamin A nutritional status. The primary outcome measure was the difference in the prevalence of VAD between the IG using home fortification with MNP and the CG. To characterize the sample, means and standard deviations or medians and interquartile ranges were calculated for each variable. The Shapiro–Wilk test was used to test the normality of the data. To analyze the differences between the variables investigated in both groups, we used the Student's *t*-test or Mann–Whitney test for continuous variables and Pearson's chi-square test for proportions. The differences were considered significant at a level of 5%.

A three-level random-intercept mixed-effects Poisson regression was used to model cluster effects for cities and health center units, adjusted for maternal education, maternal age, and child age, included to account for differences between the groups. In subsequent analyses, adjusted individual level data for vitamin A were used to compare the distributions between study groups (using *kdensity* and *normalden* procedures to illustrate the true underlying density for continuous random variables). Statistical significance was set at .05, and prevalence ratios (PR) with 95% confidence intervals (95% CI) are presented. All *P*-values were derived from two-sided statistical tests. All analyses were done with STATA 12.0 (Statacorp, College Station, TX, USA).

3 | RESULTS

One thousand two hundred twenty-five children were recruited for the ENFAC study: of whom, 1,213 were eligible (12 were excluded because of prematurity). For the present analysis, 992 children were considered eligible based on venous blood samples available. Overall, 444 children aged 11–14 months were assigned to the CG and 548 children aged 6–8 months to the IG. Among the CG children, the parents of 22 infants declined participation, and 27 children did not have sufficient blood samples for analysis, resulting to 395 children. In the IG, the parents of 106 infants declined participation, and 43 infants did not have sufficient blood samples for analysis, leaving 399 participants (Figure 1).

FIGURE 1 Flow chart for the participants from the Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar for analysis of vitamin A status

3.1 | Participant characteristics

Characteristics of the study participants are summarized in Table 1. CG children were less than 15 days older than IG children, and their mothers were 1 year older than the mothers of the IG children. Overall, 41% and 34% of the mothers from CG and IG participants, respectively, had less than 9 years of education. For this reason, these variables, along with city and primary health center, were considered in multiple model analyses. Based on the number of leftover sachets obtained at the end of the trial, 302 (75.7%) IG children consumed at least 30 sachets, and 145 (36.3%) consumed all 60 sachets as recommended.

3.2 | Biochemical indicators

Biochemical indicators and the presence of inflammation by study groups are presented in Table 2. Median serum values of retinol and beta-carotene were significantly higher in the IG than in the CG. The prevalence of VAD was lower in the IG when compared with the CG, representing a reduction of 55% in the prevalence of deficiency between groups (Figure 2). This reduction was independent of the presence of anemia [PR (95% CI) = 0.47 (0.29; 0.75)] and iron deficiency [PR (95% CI) = 0.47 (0.28; 0.79)], data not shown in tables.

Considering only healthy children (CRP $\leq$ 5 mg/L and AGP $\leq$ 1 g/L, $n = 502$), the prevalence rates of VAD were 13.2% and 3.8% in the CG

TABLE 1 Characteristics of the participants by study groups^a

Characteristic	n ^b	CG (n = 395)		IG (n = 399)		P ^c
		Mean or n	SD or %	Mean or n	SD or %	
Infants characteristic						
Female sex	794	184	46.6	203	50.9	.226
Age (months)	794	13.2	0.8	12.8	1.0	<.001
Birth weight (g)	785	3260.5	471.6	3270.3	479.5	.773
Child's skin color	769					.248
Pardo ^d		285	74.8	309	79.6	
White		70	18.4	55	14.2	
Black		26	6.8	24	6.2	
Reported use of vitamins A and D	789	103	26.3	90	22.7	.239
Maternal characteristic						
Age (years)	792	27.1	7.3	26.1	6.7	.036
Maternal education <9 years	782	160	41.3	135	34.2	.039

CG = control group = IG, intervention group; SD = standard deviations.

^aValues are numbers and percentages or mean and SD.

^bTotals differ from the total number of study children due to missing values.

^cPearson's chi-square test or Student's *t* test.

^dPardo is defined in the Brazilian census for individuals of European, African, and Amerindian ancestry

TABLE 2 Biochemical indicators and presence of inflammation by study groups^a

Characteristic	n ^b	CG (n = 395)		IG (n = 399)		P ^c
		Median, n	IQR, %	Median, n	IQR, %	
Biochemical indicators						
Retinol (μmol/L)	794	1.30	0.89, 1.80	1.54	1.20, 2.00	<.001
Vitamin A deficiency ^d	794	64	16.2	30	7.5	<.001
Anemia ^e	794	88	22.3	55	13.8	.002
Iron deficiency ^f	747	142	39.0	114	29.8	.008
Beta-carotene (μmol/L)	786	0.27	0.14, 0.50	0.36	0.22, 0.60	<.001
Presence of inflammation ^g						.008
Reference	502	242	65.0	260	75.1	
Incubation	10	7	1.9	3	0.9	
Acute	76	51	13.7	25	7.2	
Chronic	130	72	19.4	58	16.8	

CG = control group; IG = intervention group; IQR = interquartile range.

^aValues are numbers and percentages or median and IQR.

^bTotals differ from the total number of study children due to missing values.

^cPearson's chi-square test or Mann-Whitney test.

^dDefined as serum retinol <0.70 μmol/L.

^eDefined as hemoglobin <110.0 g/L.

^fDefined as plasma ferritin <12.0 μg/L or sTfR >8.3 mg/L (excluding CRP > 10.0 mg/L).

^gReference (CRP ≤ 5 mg/L and AGP ≤ 1 g/L); incubation (CRP > 5 mg/L and AGP ≤ 1 g/L); acute (CRP > 5 mg/L and AGP > 1 g/L); and chronic (CRP ≤ 5 mg/L and AGP > 1 g/L). CRP, C-reactive protein; AGP, α-1-acid glycoprotein.

FIGURE 2 Prevalence (%) of vitamin A deficiency and prevalence ratio (PR and 95% confidence interval in parentheses) for all children (n = 792), children from cities without NVASP (n = 390), and children from cities covered by NVASP (n = 400), adjusted for city, primary health center, maternal education, maternal age, and child age, according to study groups. Vitamin A deficiency defined as serum retinol <0.70 μmol/L. CG = control group; IG = intervention group; NVASP = the National Vitamin A Supplementation Program

and IG, respectively. This represented a reduction of 71% in the prevalence of VAD in the IG when compared with the CG [PR (95% CI) = 0.29 (0.13; 0.64)].

For children who were from cities covered by the National Vitamin A Supplementation Program, the reduction of VAD was 64%, and for those children from cities without this national program, the reduction was 51% when comparing the IG with the CG, though the differences were not statistically significant (Figure 2).

Figure 3 shows the vitamin A distribution by study groups using individual level data adjusted for city, primary health center, maternal

FIGURE 3 Relative frequency of serum vitamin A concentrations adjusted for city, primary health center, maternal education, maternal age, and child age in multilevel linear regression analysis (*kdensity* and *normalden* STATA procedures) by study groups. CG = control group; IG = intervention group; SE = standard error

education and age, and child age. Adjusted means of vitamin A were 0.20 μmol/L higher in the IG (P < .001), which represents a shift to the right in the vitamin A distribution.

4 | DISCUSSION

This study found that home fortification with MNP reduced the prevalence of VAD by 55% among young Brazilian children and significantly

improved the vitamin A status in this population. These findings provide evidence of the importance of using MNP to prevent VAD, as well as anemia and iron deficiency as already established by scientific literature (De-Regil et al., 2011; Dewey, Yang, & Boy, 2009) and recommended by WHO (World Health Organization, WHO, 2011b).

Currently, evidence has shown that frequent intake of vitamin A in physiological doses through food-based approaches and regular low-dose supplementation are the most effective ways to increase serum retinol and reduce VAD compared with high doses of vitamin A (Mason et al., 2015). Because the sachets of MNP should be added to the complementary feeding of the children, this strategy matches the recommendations because it provides an opportunity to promote healthy complementary feeding in childhood and improves the quality of the child's food by adding micronutrients within the nutritional requirements for this age group. In our study, we observed an increase of beta-carotene levels in children who consumed the sachets, suggesting a nutritional improvement of the complementary feeding offered to these children as a biomarker for vegetable intake. Because of these findings, we believe that both strategies (MNP + nutritional education) may have contributed to the improvement of vitamin A status in our study children.

Most micronutrient deficiencies often occur simultaneously and interact with each other (United Nations Children's Fund, UNICEF, & Micronutrient Initiative, 2004). VAD, for example, can be caused by other nutritional deficiencies, such as zinc or iron deficiency. Zinc deficiency can depress synthesis of retinol-binding protein hindering the transport of this vitamin, and zinc status appears to regulate the metabolism conversion of retinol to retinal (Christian & West, 1998). According to a study by Zlotkin et al. (2003) conducted on 437 non-anemic Ghanaian children aged 8–20 months, the use of *sprinkles* (MNP) with a mixture of 600 µg of vitamin A and 40 mg of iron did not improve serum retinol concentrations probably because of the simultaneous presence of zinc deficiency in the population studied. According to the authors, vitamin A supplementation with zinc may be the solution to this problem. In our study, the sachets contained, besides other micronutrients, 4.1 mg zinc. Moreover, iron deficiency can also influence vitamin A metabolism, possibly by the reduction in the activity of retinyl ester hydrolases, resulting in a consequent decrease in vitamin A mobilization, or from an increase in retinol sequestration to the liver (Oliveira, Michelazzo, Stefanello, & Rondó, 2008). For this reason, an intervention that gives the child a range of vitamins and minerals tends to be more effective for improving nutritional status than an approach focused only on a single micronutrient.

Another finding of our study was that home fortification with the MNP was effective, independent of the coverage of the Brazilian National Vitamin A Supplementation Program. To our knowledge, all previous studies identified in the literature that evaluated the impact of MNP on vitamin A status were carried out in areas covered with vitamin A supplementation (Zlotkin et al., 2003; Suchdev et al., 2012; Serdula et al., 2013; Jack et al., 2012; Soofi et al., 2013). A study conducted in Kenya with children aged 6–35 months observed a decrease of 7.5% in the prevalence of VAD (using plasma retinol binding protein concentration <0.7 µmol/L) in the IG, with an increase of 2.5% in the prevalence of VAD in CG children (Suchdev et al., 2012). In that study, the sachets were sold by local commercial businesses in the children's

villages, and the IG children were instructed to use one sachet per day during a period of 12 months. The sachets contained 14 multiple micronutrients, including 375 µg of vitamin A, and the average estimated intake per child was relatively low (0.9 sachets per week). It is important to highlight that the authors attributed these results to a low coverage (22%) of biannual vitamin A supplementation in this locality.

In contrast, two studies conducted in Asia with children attending healthcare centers did not observe a reduction in the prevalence of VAD (retinol binding protein < 0.7 µmol/L) after the use of MNP inside a food and nutrition education program (Jack et al., 2012; Serdula et al., 2013). In both studies, the amount of vitamin A in the sachets was 300 µg, but one study used one sachet with 14 micronutrients once a day during 6 months (Jack et al., 2012), and another received 30 sachets with five micronutrients to consume in a period of 2 months during 1-year follow-up (Serdula et al., 2013). With regard to adherence, 93.3% of the children from the first study used MNP (median of 23.8 sachets per month per child; Jack et al., 2012), and 71.2% of children from the second study were reported to currently consume the sachets (Serdula et al., 2013). The authors of both studies recognized the lack of impact of this strategy by, among other factors, the low prevalence of VAD in children studied at baseline and during the study because of the previous vitamin A supplementation in these sites.

The effectiveness of vitamin A mega dose supplementation has been extensively debated (Thorne-Lyman & Fawzi, 2011; Mason et al., 2015; Kapil & Sachdev, 2013). Several researchers advocate for this strategy because of the beneficial effects on morbidity and mortality (Mayo-Wilson, Imdad, Herzer, Yakoob, & Bhutta, 2011); however, others disagree based on the inconsistent evidence about the use of this strategy owing to the currently changing disease patterns (especially because of reductions in diarrhea and measles) and reduced prevalence of VAD (Mason et al., 2015). Of relevance to this discussion, the effectiveness of mega dose supplementation among Brazilian children is dependent not only on supplementation coverage in the city where they live but also on the health and nutrition profiles of these children. Currently, the vaccine coverage in Brazil, especially against measles, is almost universal, breastfeeding practices have improved substantially in the last decades, and access to health services as well as health interventions coverage is increasing (Victora, Aquino, do Carmo Leal, Monteiro, & Barros, 2011); all of these are conditions that may have contributed to the positive impact of this intervention in this country.

Some limitations of the present study must be considered, such as the lack of randomization and blinding as a result of the study design, the absence of individual information about the use of high doses of vitamin A supplement, and the lack of data on the habitual intake of sources of vitamin A. To decrease the potential biases of a lack of randomization and blinding, laboratory procedures were blinded during data collection and the children from the IG and CG were assessed when they were of the same age. Another important limitation is the use of serum retinol concentration as an indicator of VAD. WHO have recommended two sets of indicators of VAD for population surveys: clinical assessment of eye signs and retinol in plasma or serum. Although being homeostatically controlled and suppressed during inflammation, serum retinol concentration below

a cut-off of 0.70 $\mu\text{mol/L}$ has been used by WHO to classify those at risk for biochemical VAD for comparisons across different studies and populations. For this reason, we conducted complementary analysis correcting for inflammation as proposed by Thurnham et al. (2003). For future research, we suggest properly designed trials comparing the efficacy of supplementation with high and low doses of vitamin A for prevention of this important nutritional deficiency in childhood.

In conclusion, the results of this trial suggest that home fortification with MNP decreases the prevalence of VAD in young Brazilian children and improves the vitamin A status in this population. This strategy can be an alternative approach to reduce the vitamin A deficiency in locations with and without a vitamin A supplementation program.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to all families and health professionals as well as their research team members for their collaboration in the present study. We also want to forward special thank to Dr. Wafaie W. Fawzi for his valuable contribution during the critical review of this paper.

APPENDIX

Members of the ENFAC Working Group: Marly Augusto Cardoso, Rosângela Aparecida Augusto, Fernanda Cobayashi (Department of Nutrition, University of São Paulo, São Paulo, Brazil); Maria Claret C. M. Hadler, Maria do Rosário G. Peixoto (School of Nutrition, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil), Pedro Israel C. Lira, Leopoldina Augusta S. Sequeira (Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil), Pascoal Torres Muniz, Cristiéli Sérgio de Menezes Oliveira (Department of Health Sciences, Federal University of Acre, Rio Branco, Brazil), Márcia Regina Vitolo, Daniela Cardoso Tietzmann (Federal University of Health Science of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil), Márcia Maria Tavares Machado (Department of Preventive Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil) Patrícia Constante Jaime, Eduardo Augusto Fernandes Nilson, Gisele Ane Bortolini, Sara Araújo da Silva (Coordenação Geral de Alimentação e Nutrição, Ministry of Health, Brasília, Brazil).

SOURCE OF FUNDING

The present study was funded by the Ministry of Health of Brazil with administrative and financial management by the Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development, CNPq (grant no. 552747/2011-4). The multiple micronutrient powder (MNP) used in this study was kindly donated by UNICEF. LLSS received PhD scholarships from the CNPq (grant no. 200487/2015-9). The views expressed in the present article are those of the authors and not necessarily those of any funding agencies or others whose support is acknowledged. The funders had no role in the design and analysis of the study or in the writing of this article.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

CONTRIBUTIONS

LLSS contributed to the data collection, conducted data analyses, participated in data interpretation, wrote the initial draft of the article. RAA, DCT, LASS, MCCMH, PTM, and PICL participated in data collection, analysis, and interpretation, and were involved in the review of the article. MAC supervised all study protocols, was responsible for project management, participated in data analysis and interpretation, and was involved in the writing of the article. All authors have critically reviewed the manuscript content and have approved the final version submitted for publication.

REFERENCES

- Brasil (Ministério da Saúde) & United Nations Children's Fund (UNICEF). (2007). *Cadernos de Atenção Básica: Carenças de Micronutrientes*. Brasília: Ministério da Saúde. Available at: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cadernos_atencao_basica_carencias_micronutrientes.pdf (Accessed 22 January 2016).
- Brasil (Ministério da Saúde). (2009). *Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da criança e da mulher—PNDS 2006*. Brasília: Ministério da Saúde. Available at: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnds_crianca_mulher.pdf (Accessed 20 January 2016).
- Brasil (Ministério da Saúde). (2013). *Manual de Condutas Gerais do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A*. Brasília: Ministério da Saúde. Available at: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_condutas_suplementacao_vitamina_a.pdf (Accessed 22 January 2016).
- Brasil (Ministério da Saúde). Vitamina A—módulo gerador de relatórios. [Online] Available at: http://dabsistemas.saude.gov.br/sistemas/vitaminaA/relatorio_publico/vita_relatorio.php (Accessed 22 January 2016).
- Cardoso, M. A., Augusto, R. A., Bortolini, G. A., Oliveira, C. S. M., Tietzmann, D. C., Sequeira, L. A. S., ... the ENFAC Working Group. (2016). Effect of providing multiple micronutrients in powder through primary healthcare on anemia in young Brazilian children: A multicentre pragmatic controlled trial. *PLoS One*, 11, e0151097.
- Christian, P., & West, K. P. Jr. (1998). Interactions between zinc and vitamin A: An update. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 435S–441S.
- De-Regil, L. M., Suchdev, P. S., Vist, G. E., Wallester, S., & Peña-Rosas, J. P. (2011). Home fortification of foods with multiple micronutrient powders for health and nutrition in children under two years of age. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7, 1–84.
- De-Regil, L. M., Suchdev, P. S., Vist, G. E., Wallester, S., & Peña-Rosas, J. P. (2013). Home fortification of foods with multiple micronutrient powders for health and nutrition in children under two years of age. *Evidence Based Child Health*, 8, 112–201.
- Dewey, K. G., Yang, Z., & Boy, E. (2009). Systematic review and meta-analysis of home fortification of complementary foods. *Maternal & Child Nutrition*, 5, 283–321.
- Gomes, L. F., Alves, A. F., Sevanian, A., Peres Cde, A., Cendoroglo, M. S., de Mello-Almada, C., ... Junqueira, V. B. (2004). Role of β_2 -glycoprotein I, LDL-, and antioxidant levels in hypercholesterolemic elderly subjects. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6, 237–244.
- Hulley, S. B., Cummings, S. R., Browner, W. S., Grady, D., Hearst, N., & Newman, T. B. (Eds) (2001). *Designing clinical research: An epidemiologic approach*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Jack, S. J., Ou, K., Chea, M., Chhin, L., Devenish, R., Dunbar, M., ... Gibson, R. S. (2012). Effect of micronutrient sprinkles on reducing anemia: A cluster-randomized effectiveness trial. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 166, 842–850.
- Kapil, U., & Sachdev, H. P. S. (2013). Massive dose vitamin A programme in India—Need for a targeted approach. *Indian Journal of Medical Research*, 138, 411–417.

- Mason, J., Greiner, T., Shrimpton, R., Sanders, D., & Yukich, J. (2015). Vitamin A policies need rethinking. *International Journal of Epidemiology*, 44, 283–292.
- Mayo-Wilson, E., Imdad, A., Herzer, K., Yakoob, M. Y., & Bhutta, Z. A. (2011). Vitamin A supplements for preventing mortality, illness, and blindness in children aged under 5: Systematic review and meta-analysis. *British Medical Journal*, 343, d5094.
- Oliveira, J. M., Michelazzo, F. B., Stefanello, J., & Rondó, P. H. (2008). Influence of iron on vitamin A nutritional status. *Nutrition Reviews*, 66, 141–147.
- Serdula, M. K., Lundeen, E., Nichols, E. K., Imanalieva, C., Minbaev, M., Mamyrbaeva, T., ... Kyrgyz Republic Working Group. (2013). Effects of a large-scale micronutrient powder and young child feeding education program on the micronutrient status of children 6–24 months of age in the Kyrgyz Republic. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67, 703–707.
- Soofi, S., Cousens, S., Iqbal, S. P., Akhund, T., Khan, J., Ahmed, I., & Bhutta, Z. A. (2013). Effect of provision of daily zinc and iron with several micronutrients on growth and morbidity among young children in Pakistan: A cluster randomised trial. *Lancet*, 382, 29–40.
- Stevens, G. A., Bennett, J. E., Hennocq, Q., Lu, Y., De-Regil, L. M., Rogers, L., ... Ezzati, M. (2015). Trends and mortality effects of vitamin A deficiency in children in 138 low-income and middle-income countries between 1991 and 2013: A pooled analysis of population-based surveys. *Lancet Global Health*, 3, e528–e536.
- Suchdev, P. S., Ruth, L. J., Woodruff, B. A., Mbakaya, C., Mandava, U., Flores-Ayala, R., ... Quick, R. (2012). Selling sprinkles micronutrient powder reduces anemia, iron deficiency, and vitamin A deficiency in young children in Western Kenya: A cluster-randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95, 1223–1230.
- Thorne-Lyman, A., & Fawzi, W. W. (2011). Improving child survival through vitamin A supplementation. *British Medical Journal*, 343, d5294.
- Thurnham, D. I., McCabe, G. P., Northrop-Clewes, C. A., & Nestel, P. (2003). Effects of subclinical infection on plasma retinol concentrations and assessment of prevalence of vitamin A deficiency: Meta-analysis. *Lancet*, 362, 2052–2058.
- United Nations Children's Fund (UNICEF) & Micronutrient Initiative. (2004). Vitamin and mineral deficiency: A global damage assessment report. [Online] Available at: http://www.unicef.org/media/files/davos_micronutrient.pdf (Accessed 10 January 2016).
- Victora, C. G., Aquino, E. M. L., do Carmo Leal, M., Monteiro, C. A., & Barros, F. C. (2011). Maternal and child health in Brazil: Progress and challenges. *Lancet*, 377, 1863–1876.
- World Health Organization (WHO). (1996). *Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programme*. Geneva: WHO.
- World Health Organization (WHO). (2001). *Iron deficiency anaemia: Assessment, prevention and control A guide for programme managers*. Geneva: WHO.
- World Health Organization (WHO). (2009). *Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005 (WHO Global Database on Vitamin A Deficiency)*. Geneva: WHO.
- World Health Organization (WHO). (2011a). *Serum retinol concentrations for determining the prevalence of vitamin A deficiency in populations (Vitamin and Mineral Nutrition Information System)*. Geneva: WHO.
- World Health Organization (WHO). (2011b). *Guideline: Use of multiple micronutrient powders for home fortification of foods consumed by infants and children 6–23 months of age*. Geneva: WHO.
- World Health Organization (WHO). (2011c). *Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity Vitamin and Mineral Nutrition Information System*. Geneva: WHO.
- Zlotkin, S., Antwi, K. Y., Schauer, C., & Yeung, G. (2003). Use of microencapsulated iron (II) fumarate sprinkles to prevent recurrence of anemia in infants and young children at high risk. *Bulletin of the World Health Organization*, 81, 108–115.

How to cite this article: Silva LLS, Augusto RA, Tietzmann DC, et al. The impact of home fortification with multiple micronutrient powder on vitamin A status in young children: A multicenter pragmatic controlled trial in Brazil. *Matern Child Nutr*. 2017;13:e12403. <https://doi.org/10.1111/mcn.12403>

4.2 ARTIGO 2

Factors associated with anemia in young children in Brazil

(Artigo original submetido para publicação)

O objetivo principal deste artigo foi avaliar os fatores associados à anemia nas crianças do grupo controle do ENFAC. Esta investigação se fez necessária para a identificação da frequência de anemia nessas crianças antes da intervenção, além de identificar os fatores que estão associados a esse desfecho e podem ser utilizados na proposição de novas estratégias para prevenção e controle dessa condição no Brasil.

Para este estudo, foram consideradas somente as crianças do GC do ENFAC, com a casuística de 520 crianças com idade entre 11 e 15 meses atendidas nas 24 UBS participantes do estudo.

Dentre os principais achados deste estudo destaca-se que a frequência de anemia nas crianças estudadas foi de 23,1%, sendo mais prevalente nas crianças que viviam com mais de uma criança menor de cinco anos na casa; naquelas que começaram a receber frutas e verduras depois de oito meses de idade; nas crianças desnutridas; nas que passaram por uma hospitalização prévia e nas crianças que apresentavam menores concentrações de folato sérico.

Sendo assim, essa investigação concluiu que são necessárias melhorias nas atuais estratégias de prevenção e controle da anemia no Brasil relacionadas à promoção de uma alimentação complementar saudável, além de um melhor controle de morbidades, a fim de reduzir a prevalência de anemia em crianças atendidas na Atenção Básica à Saúde no país.

Factors associated with anemia in young children in Brazil

Short Title: Anemia in Brazilian young children

Lara Livia Santos da Silva^{1¶}, Wafaie Wahib Fawzi^{2¶}, Marly Augusto Cardoso^{1¶*}, ENFAC Working Group[^]

¹Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Global Health and Population, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, Massachusetts, United States of America

* Corresponding author

Email: marlyac@usp.br (MAC)

¶ These authors contributed equally to this work.

[^]Membership of the ENFAC Working Group is provided in the Acknowledgments.

Abstract

Background: Anemia is recognized as a major public health problem in childhood, especially in children under 24 months of age. Despite improvements in public health strategies to prevent and control anemia in Brazilian young children in the last decade, few studies have assessed the predictors for this condition in primary health care. Thus, this study aimed to assess the associated factors of anemia in young children who visited primary public health care facilities in Brazil.

Methods: A cross-sectional study was conducted with 520 children aged 11 to 15 months who visited the primary health care in four Brazilian cities. Anemia was defined as hemoglobin concentration < 110 g/L in venous blood samples. Multilevel Poisson regression models were used to describe the associations between anemia and independent variables.

Results: The frequency of anemia was 23.1%. A higher frequency was observed in children who live with more than one other child younger than 5 years in the house (Prevalence Ratio [PR] 1.47; 95% Confidence Interval [CI] 1.01–2.14), who started to receive fruits and vegetables after 8 months of age (PR 1.92; 95% CI 1.19–3.10), who were stunted (PR 2.44; 95% CI 1.32–4.50), who were hospitalized at least once in their life (PR 1.55; 95% CI 1.03–2.33) and who were in the lower tertile of serum folate concentration (PR 2.24; 95% CI 1.30–3.85).

Conclusions: Inadequate complementary feeding practices and morbidity were the main predictors for anemia in early childhood in this population. Improvements in current strategies to promote healthy complementary feeding along with better control of morbidities are recommended to reduce anemia in Brazilian young children.

53 **Introduction**

54 Anemia refers to a condition in which the blood hemoglobin concentration is lower than
55 normal [1], resulting in poor cognitive and motor development in children and loss of work
56 productivity in adulthood [2, 3].

57 Iron deficiency is thought to be the most common cause of anemia. It is estimated that about
58 50% of anemia cases are attributed to this micronutrient deficiency [3], although this proportion
59 probably varies substantially across regions and countries [4]. Other causes of anemia include other
60 micronutrient deficiencies, such as folic acid, vitamin A and vitamin B12 deficiencies; the presence
61 of infectious diseases and genetic hemoglobin disorders [2].

62 Worldwide, it is estimated that 1.62 billion people have anemia, which represents one-
63 quarter of the world's population, with a higher prevalence in developing countries (9.1%, 25.7%
64 and 42.8% in high, medium and low income countries, respectively). Preschool children, pregnant
65 and non-pregnant women are the three groups most at risk of anemia [5].

66 In 2011, it was estimated that 273.2 million children aged 6 to 59 months had anemia, which
67 represents 42.6% of this population globally. Africa is the region with highest prevalence of anemia
68 in preschool children (62.3%), followed by the Southeast Asia region (53.8%) and the Eastern
69 Mediterranean region (48.6%) [6]. In Brazil, the latest Demographic Health Survey revealed that
70 20.9% of children under 5 years old had anemia in 2006 [7].

71 Studies have shown that children under 24 months of age are at high risk for anemia [8, 9].
72 This can be explained by the rapid growth in this age group with a consequently increased demand
73 for iron and other micronutrients as well as a higher susceptibility to infections [8, 10].
74 Socioeconomic and environmental factors seem to be closely associated with anemia in these
75 children [8, 11, 12].

76 Given the importance of the crucial period from conception to the first 2 years of life—the

1000 days—to prevent adverse effects later in the life course [13], it is important to systematically investigate the predictors for anemia in early childhood. Thus, this study aimed to assess the predictors of anemia in young children attending at primary health care in four Brazilian cities.

Materials and Methods

Study design, settings and participants

This cross-sectional study is part of the “*Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar*” (ENFAC Study), which was previously reported [14]. Briefly, the ENFAC Study is a pragmatic, controlled clinical trial conducted in four cities (Rio Branco, Olinda, Goiânia and Porto Alegre) from different regions of Brazil. The ENFAC study was designed to evaluate the impact of multiple micronutrient powder on anemia and nutritional deficiencies of children who visited primary health care. A sample size of at least 105 children in each city and a study group (control and intervention groups) was necessary. Considering an additional 30% to cover for possible withdrawals and refusals, 540 children were expected for each group.

For the present analysis, the study population was composed of all children from the control group, aged 11-15 months, and receiving routine pediatric care at 24 large primary health care centers. The eligibility criteria of the study were parental approval to participate in the study and not currently receiving treatment for anemia. Children who were born prematurely (< 37 weeks’ gestation), twins, had reported cases of HIV infection, malaria, tuberculosis or genetic hemoglobin disorders, and fever (> 39° C) on the day of blood sampling were excluded.

Overall, 543 children were invited to participate; parents of 22 children (4.1%) declined participation and one child did not provide a blood sample, resulting in a final sample of 520 children. Assuming that the prevalence of anemia in children aged 6-24 months is 40.0% [9], this sample size allowed the detection of the prevalence of anemia with 90% power and a significance level of 0.05.

102 Written informed consent was obtained from the caregivers of all children after they had
 103 been informed of the objectives, benefits and possible risks of the study. All procedures were
 104 performed in accordance with ethical standards, and the study was approved by The Human Ethical
 105 Review Board of the School of Public Health, University of São Paulo, Brazil.

106

107 **Data collection**

108 From June 2012 to January 2013, caregivers of children visiting primary health care centers
 109 were invited to participate in this study. During enrollment, trained fieldworkers applied a
 110 structured questionnaire through a face-to-face interview with each child's caregiver, which
 111 contained information on socioeconomic, environmental and demographic characteristics of the
 112 child, as well as information on child's birth, maternal data, infant feeding practices,
 113 supplementation and morbidities.

114 After the interview, the length of each child was measured by trained research assistants
 115 using standardized procedures and calibrated equipment. Children were measured in dorsal
 116 decubitus, on a flat surface, using portable infant measuring boards (model ES-2000, Sanny, Los
 117 Angeles, USA). Each measurement was repeated, and the mean value was calculated. Acceptable
 118 measurements were those in which the maximum length variation was 0.5 cm. Z-scores of
 119 length/height-for-age (HAZ) were calculated according to the World Health Organization Child
 120 Growth Standards [15] and those with Z-scores ≥ 4 e ≤ -4 were excluded from the analysis. Stunting
 121 was defined as HAZ of < -2 [16].

122 Fasting venous blood samples were collected by properly trained technicians up to a week
 123 after the interview. It was collected in the morning on a day previously scheduled with the
 124 caregivers. At the field laboratory, hemoglobin concentration was determined at the time of blood
 125 collection by a portable hemoglobinometer (Hb301; HemoCue®, Angelholm, Sweden). A separate
 126 blood sample was protected from light and centrifuged within 1 hour of collection. After
 127 centrifugation, serum and plasma samples were separated in microtubes and frozen at -20°C before

128 being shipped to the Laboratory of Human Nutrition in the School of Public Health, São Paulo, on
 129 dry ice and maintained at -70°C until further analysis.

130 In São Paulo, plasma ferritin and soluble transferrin receptor (sTfR) concentrations were
 131 measured using commercially available enzyme immunoassays (Ramco, Houston, TX, USA).
 132 Serum concentrations of retinol were measured by High Performance Liquid Chromatography
 133 (HPLC) methods (HP-1100 HPLC system, Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA) as
 134 previously described [14], and serum folate concentrations were measured using commercial
 135 fluoroimmunoassays (PerkinElmer, Wallac Oy, Turku, Finland). C-reactive protein (CRP) and
 136 alpha-1-acid glycoprotein (AGP) were determined using an IMAGE Immunochemistry System
 137 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

138 Anemia was defined as hemoglobin concentration < 110 g/L as established by the World
 139 Health Organization [1]. Mild, moderate and severe anemia was defined as hemoglobin
 140 concentration of 100–109 g/L, 70–99 g/L and lower than 70 g/L, respectively [1]. Iron deficiency
 141 was defined as plasma ferritin concentrations < 12 µg/L and/or sTfR > 8.3 mg/L [17] and iron
 142 deficiency anemia was defined as hemoglobin concentration < 110 g/L with plasma ferritin < 12
 143 µg/L and/or sTfR > 8.3 mg/L. Children with serum retinol concentration < 1.05 µmol/L were
 144 considered to have marginal vitamin A status. Serum folate concentrations were analyzed in tertiles.
 145 The concentrations of CRP > 5 mg/L and AGP > 1 g/L were considered to indicate the presence of
 146 inflammation [18].

147 Children who were anemic or had any nutritional deficiency diagnosed during the study
 148 were referred for treatment to primary health care facilities.

149

150 **Statistical analysis**

151 Stata statistical software package 12.0 (Statacorp, College Station, Texas, USA) was used
 152 for data analysis. The main dependent variable was anemia and the independent variables were:
 153 child's sex and age; child's ethnicity (classified according to skin color as used in the Brazilian

census); maternal schooling, age and marital status; water supply, categorized as no public network and public network; drinking water treatment, categorized as inadequate (untreated or chlorinated) and adequate (filtered, boiled or mineral); sanitary sewer, categorized as no public sewage or public sewage; number of children aged less than 5 years living in the child's house; child's birth weight; breastfeeding in the first hour of life; duration of breastfeeding; timing of introduction of fruits and/or vegetables, meat and beans, defined as early (< 6 months), adequate (≥ 6 months - < 8 months) and late (≥ 8 months); iron and vitamin A plus D supplementation; stunting; hospitalization at least once in life; presence of diarrhea, fever and wheezing in the past 15 days; previous diagnosis of anemia; presence of inflammation; iron deficiency; marginal vitamin A status and folate in tertiles.

Prevalence ratios (PR) were estimated using multilevel mixed-effects Poisson regression models. For this analysis, a hierarchical conceptual framework model with three levels of determination was used for the selection of independent variables, as proposed by Cardoso et al. [9]. The most distal level included socioeconomic, demographic and environmental characteristics; the intermediate level of birth variables, infant feeding practices and use of supplements; and the proximal level of anthropometric variables, reported morbidity and biochemical indicators. Crude analysis controlling for city, child's age and sex were conducted for selecting variables to be tested in multiple models ($P \leq 0.20$). Then, at each level of determination, variables were retained in the model if they were associated with the outcome at $P < 0.10$ or if their inclusion in the model changed the PR by 10% or more. The predictors of anemia were considered if, after the adjustment for potential factors at the same level and hierarchically superior levels, presented $P < 0.05$ in the final model. Missing observations were included in the multiple models by creating missing-value categories.

177

178 Results

179 A total of 520 children aged 11 to 15 months were included in this study. The characteristics
 180 of the children are shown in Table 1. The mean (standard deviation) age of the participants was 13.5
 181 (1.0) months, 50.6% were male and 76.5% were classified as mixed ethnicity. The mothers of
 182 almost 80% of the children had more than 7 years of education. About 5% of the study children
 183 were stunted and 14.6% had signs of inflammation.
 184

185 **Table 1. Characteristics of Brazilian young children who visited primary health care.**

Variables	n (%) ^a or mean $\pm$ SD
Age (months)	13.5 $\pm$ 1.0
Sex	
Male	263 (50.6)
Female	257 (49.4)
Ethnicity/Skin color	
White	86 (17.1)
Mixed/Brown	385 (76.5)
Black	32 (6.4)
Maternal education (years)	
< 7	103 (20.3)
≥ 7 - < 11	187 (36.8)
≥ 11	218 (42.9)
Birth weight (g)	
< 2500	29 (5.7)
≥ 2500 - < 3500	332 (64.8)
≥ 3500	151 (29.5)
Breastfeeding duration	
< 6 months	148 (28.7)

≥ 6 months	368 (71.3)
Stunting ^b	25 (4.9)
Presence of inflammation ^c	68 (14.6)

SD, standard deviation.

^a Totals differ from the total number of study children because of missing values.

^b Defined as HAZ < -2 Z-score.

^c Defined as CRP > 5 mg/L and AGP > 1 g/L.

The overall frequency of anemia, iron deficiency and iron deficiency anemia were 23.1%, 37.4% and 10.3%, respectively. Among all children, 81 (15.6%) presented mild anemia, 31 (6.0%) moderate anemia, and 8 (1.5%) severe anemia (Table 2). Median (interquartile range) hemoglobin concentration of the children was 118 (110-126) g/L.

Table 2. Frequency of anemia, iron deficiency, iron deficiency anemia and anemia severity among Brazilian young children who visited primary health care.

Biochemical indicators	Total ^a	n (%)
Anemia	520	120 (23.1)
Iron deficiency ^b	503	188 (37.4)
Iron deficiency anemia ^c	503	52 (10.3)
Frequency of anemia severity	520	
No anemia		400 (76.9)
Mild (Hb = 100-109 g/L)		81 (15.6)
Moderate (Hb = 70-99 g/L)		31 (6.0)
Severe (Hb < 70 g/L)		8 (1.5)

Hb, blood hemoglobin concentration.

^a Totals differ from the total number of study children because of missing values.

^b Defined as plasma ferritin < 12 µg/L and/or sTfR > 8.3 mg/L.

^c Defined as hemoglobin concentration < 110 g/L with plasma ferritin < 12 µg/L and/or sTfR > 8.3 mg/L.

Table 3 shows the results of the multiple analyses between the independent variables and anemia. In the crude analysis, more than one child younger than 5 years in the house, introduction of fruits and vegetables after 8 months of age, stunting, signs of current inflammation, marginal vitamin A status and low folate concentration were associated with high risk of anemia in these children. In the multiple analysis, signs of current inflammation and marginal vitamin A status lost association with anemia while more than one child younger than 5 years in the house (PR 1.47; 95% CI 1.01–2.14; p = 0.044), introduction of fruits and/or vegetables after 8 months of age (PR 1.92; 95% CI 1.19–3.10; p = 0.007), stunting (PR 2.44; 95% CI 1.32–4.50; p = 0.005), and low folate concentration (PR 2.24; 95% CI 1.30–3.85; p = 0.003) remained significantly associated with this outcome in this population. Previous hospitalization became statistically associated with anemia only after multiple analysis (PR 1.55; 95% CI 1.03–2.33; p = 0.036).

Table 3. Associated factors for anemia in Brazilian young children who visited primary health care.

Variables	n	Crude		Multiple adjustment	
		PR (95% CI)	P-value ^a	PR (95% CI)	P-value ^b
Maternal schooling (years)					
< 7	103	Ref.	-	Ref.	-
≥ 7 - < 11	187	0.80 (0.50-1.27)	0.337	0.82 (0.52-1.32)	0.422
≥ 11	218	0.62 (0.38-1.00)	0.051	0.69 (0.42-1.14)	0.148
Drinking water treatment					
Inadequate	217	Ref.	-	Ref.	-

Adequate	303	0.73 (0.48-1.09)	0.126	0.81 (0.53-1.23)	0.329
Children younger than 5 years in the house					
1 child	379	Ref.	-	Ref.	-
> 1 child	141	1.55 (1.07-2.24)	0.021	1.47 (1.01-2.14)	0.044
Birth weight (g)					
< 2500	29	1.27 (0.65-2.46)	0.485	1.45 (0.74-2.85)	0.281
≥ 2500 - < 3500	332	Ref.	-	Ref.	-
≥ 3500	151	0.69 (0.44-1.08)	0.103	0.71 (0.45-1.11)	0.132
Introduction of fruits or/and vegetables ^c					
Early	217	1.14 (0.74-1.75)	0.561	1.03 (0.67-1.61)	0.877
Adequate	211	Ref.	-	Ref.	-
Late	90	2.08 (1.29-3.33)	0.002	1.92 (1.19-3.10)	0.007
Stunting ^d					
No	483	Ref.	-	Ref.	-
Yes	25	2.49 (1.38-4.50)	0.003	2.44 (1.32-4.50)	0.005
Hospitalization at least once					
No	396	Ref.	-	Ref.	-
Yes	124	1.39 (0.93-2.07)	0.103	1.55 (1.03-2.33)	0.036
Presence of inflammation ^e					
No	399	Ref.	-	Ref.	-
Yes	68	1.97 (1.27-3.05)	0.003	1.57 (0.97-2.54)	0.065
Iron deficiency ^f					
No	315	Ref.	-	Ref.	-
Yes	188	1.38 (0.91-2.08)	0.129	1.35 (0.88-2.07)	0.163

Marginal vitamin A status ^g					
No	322	Ref.	-	Ref.	-
Yes	172	1.53 (1.05-2.25)	0.028	1.31 (0.86-1.99)	0.208
Folate (nmol/L)					
1 tercil (6.3–32.2)	152	2.54 (1.49-4.33)	0.001	2.24 (1.30-3.85)	0.003
2 tercil (32.4–50.1)	152	1.69 (0.96-2.99)	0.070	1.58 (0.89-2.82)	0.119
3 tercil (> 50.1)	156	Ref.	-	Ref.	-

218 PR, prevalence ratio; CI, confidence interval.

219 ^a *P* values were estimated by multilevel mixed-effects Poisson regression models adjusted for
 220 child's sex and age.

221 ^b *P* values were estimated by multilevel mixed-effects Poisson regression models adjusted for
 222 child's sex and age and the variables in the previous blocks.

223 ^c Defined as early (< 6 months); adequate ($\geq$ 6 months - < 8 months); late ($\geq$ 8 months).

224 ^d Defined as HAZ < -2 Z-score.

225 ^e Defined as CRP > 5 mg/L and AGP > 1 g/L.

226 ^f Defined as plasma ferritin < 12 μ g/L and/or sTfR > 8.3 mg/L.

227 ^g Defined as serum retinol < 1.05 μ mol/L.

228 Missing observations were included in the analysis by creating missing-values categories.

229

230 Discussion

231 In this study, 23.1% of children aged 11-15 months who visited primary health care facilities
 232 in Brazil were anemic. The main associated factors of anemia in this study were children who lived
 233 with more than one child younger than 5 years in the house, those who started to receive fruits
 234 and/or vegetables after 8 months of age, were stunted, were hospitalized at least once in their life
 235 and those in the lowest tertile of folate concentration.

236 The frequency of anemia in this study was lower than the prevalence found in other studies
237 conducted in Brazil among children younger than 24 months of age [9, 19]. A systematic review
238 conducted with studies published from 1996 to 2006 found that, among Brazilian children who
239 visited health care services, the prevalence of anemia ranged from 55.6% to 65.4% in children
240 under 12 months of age and from 55.1% to 89.1% in children aged 12 to 24 months [20]. A
241 population-based study carried out in 2006-2007 in southern Brazil showed that 76% of children
242 between 18 and 23 months had anemia [19] and study conducted in Acrelândia (Western Brazilian
243 Amazonia) in 2007, identified anemia in 40% of children aged 6 to 24 months [9].

244 A possible explanation for the lower frequency of anemia noted in this study may be
245 because of the greater investment and attention of the Brazilian government in actions to improve
246 child health in the last three decades [21]. This affirmation corroborates with a population-based
247 cohort study carried out in Brazil, which identified a lower prevalence of anemia in children
248 younger than 36 months of age between the years 2008 and 2009. Although the authors had
249 discussed the differences in the methodology used for the diagnosis of anemia in both assessments,
250 they also justified this reduction by the ferrous sulfate and antiparasitic treatments that were
251 provided by public health services [22]. Nevertheless, it is important to highlight that, although the
252 frequency found in the present study was lower than the prevalence found in previously published
253 studies, it is still high and of concern because of the severe consequences of anemia in young
254 children [17].

255 In Brazil, one of the main strategies to prevent and control anemia in young children is
256 promoted by the National Program of Iron Supplementation, created in 2005, that distributes iron
257 supplementation for all children aged 6 to 24 months, and pregnant and lactating women. Although
258 several studies have showed the efficacy of iron supplements to prevent iron deficiency anemia in
259 children [23, 24], the major challenge of this strategy is its low effectiveness because of the side
260 effects of iron supplement intake, often attributed to the gastrointestinal intolerance [24, 25]. In the
261 present study, iron supplementation was not significantly associated with anemia, suggesting low

262 adherence in these young children. Unfortunately, we have no data on adherence to the use of
263 ferrous sulfate to explain this lack of association, but a study conducted with children between 6
264 and 12 months of age who visited public health services in Viçosa, Brazil, observed that children
265 who did not receive iron supplements had 2.39 times greater chance of having anemia than those
266 who received these supplements [12].

267 Other important actions to prevent and control anemia in young children in Brazil is the
268 promotion of exclusive breastfeeding during the first 6 months of life and a healthy and timely
269 introduction of complementary feeding. Although we found no association between duration of
270 breastfeeding and anemia in this study, we found that children who started to receive fruit and/or
271 vegetables after 8 months of age were two times more likely to have anemia than children who
272 received these foods between 6 to 8 months of age. According to Davidsson [26], full-term
273 breastfed infants generally have adequate iron status during the first 4–6 months of life, but after
274 this time, when iron stores have been depleted and the breast milk is no longer sufficient to meet the
275 high demand of this mineral in this age, additional dietary iron needs to be supplied for the rapidly
276 expanding blood volume. Although fruits and vegetables are not the best sources of iron in a diet,
277 several of these foods contain ascorbic acid that improves iron absorption [26, 27]. Thus, actions to
278 promote a healthy and timely introduction of complementary feeding needs to be more thoroughly
279 encouraged in primary health care settings in Brazil to reduce anemia in at-risk children.

280 In this study, children who were hospitalized at least once in life had higher risk for anemia
281 compared with those who were never hospitalized. In addition, those with a current presence of
282 infection had also higher risk for anemia compared with those who were healthy, although this was
283 only marginally significant ($p = 0.065$). In Brazil, the main causes of hospitalization in children
284 under 4 years old are respiratory diseases followed by parasitic infectious diseases [28]. According
285 to the literature, infectious diseases are a common cause of anemia in childhood, and anemic
286 children are more susceptible to infectious diseases [8]. Furthermore, the duration and severity of
287 the infection is also highly related to the development of anemia [29]. Infectious diseases are

288 important causes of anemia because they reduce dietary intake and the absorption of nutrients, and
289 deplete body stores of iron and other micronutrients. However, iron deficiency may also increase
290 the risk of infection as iron is necessary for normal immune function, creating a vicious cycle
291 between anemia and infectious diseases [30].

292 Stunting was also associated with anemia in this study. Stunted children had a 2.4 times
293 higher risk for anemia compared with those who were not stunted. This finding is in accordance
294 with other studies published in the literature [8, 11, 22]. According to Woldie et al. [11], this
295 association can be explained by noting three aspects: 1) undernourished children are often anemic,
296 2) low hemoglobin concentration can compromise linear growth, and 3) the coexistence of other
297 micronutrient deficiencies and stunting may increase the development of anemia by a synergistic
298 association. Thus, actions to prevent stunting in children will also contribute to the reduction of
299 anemia in childhood.

300 It is estimated that 50% of the cases of anemia is due to iron deficiency [3]. In our study, we
301 found that 37.4% of children were iron deficient and 10.3% were iron deficiency anemic. In
302 multiple analyses, the frequency of anemia among iron deficient children was 35% higher than
303 those with no iron deficiency, but it was only marginally significant. In a crude analysis, marginal
304 vitamin A status was significantly associated with anemia but lost association in multiple analyses.
305 As for the folate concentration, we observed a high risk for anemia among children in the lowest
306 tertile of folate concentration when compared with children in the highest tertile of folate
307 concentration. These findings strengthen the evidence that multiple micronutrient deficiencies are
308 important risk factors for anemia [9, 31].

309 Based on this evidence and aiming to reinforce current strategies to prevent and control
310 anemia in childhood, the Ministry of Health of Brazil launched in 2014 the NUTRISUS (“Multiple
311 Micronutrient in Powder Fortification Strategy”), which consists of the addition of a sachet
312 containing a mixture of vitamins and minerals in powder form to be added to one meal offered daily
313 to children aged 6 to 36 months who visit public day care centers. This strategy is recommended by

the World Health Organization in settings where the prevalence of anemia in children aged under 2 years or under 5 years is 20% or higher and is based on a body of evidence that has shown that this strategy was efficient for reducing anemia in 26% and iron deficiency in 52% among young children from 6 to 23 months of age [32].

There are some limitations to our study. First, the cross-sectional nature of this study is a potential limitation because this kind of study does not allow one to infer causality and results must thus be interpreted carefully. Furthermore, the use of a sample of users of the health care centers does not allow the extrapolation of results for the general infant population of Brazil. Despite that, it is important to mention that this study is one of the most comprehensive studies on anemia in young children carried out in different regions of the country over the past decade.

Conclusions

Anemia was found to be a moderate public health problem in Brazilian young children who visited primary health care facilities. More than one child younger than 5 years in the house, introduction of fruits and/or vegetables after 8 months of age, stunting, previous hospitalization and low folate concentration were associated with high risk for anemia. Improvements to the current strategies for preventing and controlling anemia in Brazil, along with better control of morbidity, are recommended for reducing anemia in children who visit primary health care in this country.

Acknowledgements

The authors are grateful to all the participants and health professionals involved in this study. Members of the ENFAC Working Group are as follows: Marly A Cardoso, Rosângela A Augusto, Fernanda Cobayashi (Departament of Nutrition, University of São Paulo, São Paulo, Brazil); Maria Claret CM Hadler, Maria do Rosário G Peixoto (School of Nutrition, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil), Pedro IC Lira, Leopoldina AS Sequeira (Department of Nutrition, Federal

339 University of Pernambuco, Recife, Brazil), Pascoal T Muniz, Cristiéli SM Oliveira (Department of
 340 Health Sciences, Federal University of Acre, Rio Branco, Brazil), Márcia R Vitolo, Daniela C
 341 Tietzmann (Federal University of Health Science of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil), Márcia MT
 342 Machado (Department of Preventive Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil)
 343 Patrícia C Jaime, Eduardo AF Nilson, Gisele A Bortolini, Sara A Silva (Coordenação Geral de
 344 Alimentação e Nutrição, Ministry of Health, Brasília, Brazil).

345

346 **References**

- 347 1. World Health Organization. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and
 348 assessment of severity. 2011. Available from:
 349 <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin/en/>. Accessed 31 Jul 2017.
- 350
- 351 2. Balarajan Y, Ramakrishnan U, Ozaltin E, Shankar AH, Subramanian SV. Anaemia in low-
 352 income and middle-income countries. *Lancet*. 2011. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62304-5.
- 353
- 354 3. Stoltzfus RJ, Mullany L, Black RE. Iron deficiency anaemia. In: Ezzati M, Lopez AD, Rodgers
 355 A, Murray CJL, editors. *Comparative quantification of health risks: global and regional burden of*
 356 *disease attributable to selected major risk factors*. Geneva: World Health Organization; 2004.
 357 pp.163–210.
- 358
- 359 4. Stevens GA, Finucane MM, De-Regil LM, Paciorek CJ, Flaxman SR, Branca F, et al. Global,
 360 regional, and national trends in haemoglobin concentration and prevalence of total and severe
 361 anaemia in children and pregnant and non-pregnant women for 1995-2011: a systematic analysis of
 362 population- representative data. *Lancet Glob Health*. 2013; 1: e16-e25.

363

- 364 5. McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B. Worldwide prevalence of anaemia,
365 WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993–2005. *Public Health Nutr.*
366 2009;12: 444–454.
- 367
- 368 6. World Health Organization. The Global Prevalence of Anemia in 2011. 2015. Available from:
369 http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/global_prevalence_anaemia_2011/en/.
370 Accessed 31 Jul 2017.
- 371
- 372 7. Brasil. Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da criança e da mulher PNDS 2006: dimensões
373 do processo reprodutivo e da saúde da criança. 2009. Available from:
374 http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnds_crianca_mulher.pdf. Accessed 31 Jul 2017.
- 375
- 376 8. Zhao A, Zhang Y, Peng Y, Li J, Yang T, Liu Z, et al. Prevalence of anemia and its risk factors
377 among children 6-36 months old in Burma. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87: 306-311.
- 378
- 379 9. Cardoso MA, Scopel KK, Muniz PT, Villamor E, Ferreira UM. Underlying factors associated
380 with anemia in Amazonian children: a population-based, cross-sectional study. *PLoS One.* 2012;7:
381 e36341.
- 382
- 383 10. Kotecha PV. Nutritional anemia in young children with focus on Asia and India. *Indian J*
384 *Community Med.* 2011;36: 8-16.
- 385
- 386 11. Woldie H, Kebede Y, Tariku A. Factors Associated with Anemia among Children Aged 6-23
387 Months Attending Growth Monitoring at Tsitsika Health Center, Wag-Himra Zone, Northeast
388 Ethiopia. *J Nutr Metab.* 2015. doi: 10.1155/2015/928632.
- 389

- 390 12. Silva DG, Priore SE, Franceschini SCC. Risk factors for anemia in infants assisted by public
391 health services: the importance of feeding practices and iron supplementation. *J Pediatr (Rio J)*.
392 2007;83: 149-156.
- 393
- 394 13. Victora CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell R, Richter L, et al. Maternal and child
395 undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet*. 2008;371: 340–357.
- 396
- 397 14. Cardoso MA, Augusto RA, Bortolini GA, Oliveira CSM, Tietzman DC, Sequeira LAS, et al.
398 Effect of Providing Multiple Micronutrients in Powder through Primary Healthcare on Anemia in
399 Young Brazilian Children: A Multicentre Pragmatic Controlled Trial. *PLoS One*. 2016;11:
400 e0151097.
- 401
- 402 15. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards based on
403 length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl*. 2006;450 :76-85.
- 404
- 405 16. WHO Expert Committee on Physical Status. Physical status: the use and interpretation of
406 anthropometry: report of a WHO Expert Committee. 1995. Available from:
407 http://www.who.int/childgrowth/publications/physical_status/en/. Accessed 31 Jul 2017.
- 408
- 409 17. World Health Organization. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. A
410 guide for programme managers. 2001. Available from:
411 http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/WHO_NHD_01
412 .3/en/. Accessed 31 Jul 2017.
- 413

- 414 18. Thurnham DI, McCabe LD, Haldar S, Wieringa FT, Northrop-Clewes CA, McGabe GP.
415 Adjusting plasma ferritin concentrations to remove the effects of subclinical inflammation in the
416 assessment of iron deficiency: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2010;92: 546-555.
417
- 418 19. Silla LM, Zelmanowicz A, Mito I, Michalowski M, Hellwing T, Shilling MA, et al. High
419 prevalence of anemia in children and adult women in an urban population in southern
420 Brazil. *PLoS One.* 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0068805.
421
- 422 20. Vieira RCS, Ferreira HS. Prevalência de anemia em crianças brasileiras, segundo diferentes
423 cenários epidemiológicos (Prevalence of anemia in Brazilian children indifferente epidemiological
424 scenarios). *Rev Nutr.* 2010;23: 433–444.
425
- 426 21. Victora CG, Aquino EML, do Carmo Leal M, Monteiro CA, Barros FC, Szwarcwald CL.
427 Maternal and child health in Brazil: progress and challenges. *Lancet.* 2011;377: 1863-1876.
428
- 429 22. Zanin FH, da Silva CA, Bonomo É, Teixeira RA, Pereira CA, dos Santos KB, et al.
430 Determinants of Iron Deficiency Anemia in a Cohort of Children Aged 6-71 Months Living in the
431 Northeast of Minas Gerais, Brazil. *PLoS One.* 2015;10: e0139555.
432
- 433 23. Allen LH. Iron supplements: scientific issues concerning efficacy and implications for research
434 and programs. *J Nutr.* 2002;132: 813S-819S.
435
- 436 24. De-Regil LM, Jefferds ME, Sylvetsky AC, Dowswell T. Intermittent iron supplementation for
437 improving nutrition and development in children under 12 years of age. *Cochrane Database Syst*
438 *Rev.* 2011. doi: 10.1002/14651858.CD009085.pub2.
439

- 440 25. Azeredo CM, Cotta RM, Sant'Ana LF, Franceschini Sdo C, Ribeiro Rde C, Lamounier JA, et al.
441 Greater effectiveness of daily iron supplementation scheme in infants. *Rev Saude Publica*. 2010;44:
442 230-239.
443
- 444 26. Davidsson L. Approaches to improve iron bioavailability from complementary foods. *J Nutr*.
445 2003;133: 1560S-1562S.
446
- 447 27. Allen LH, Ahluwalia N. Improving iron status through diet: the application of knowledge
448 concerning dietary iron bioavailability in Human Population. Washington, DC: John Snow, INC;
449 1997.
450
- 451 28. Oliveira BRG, Vieira CS, Collet N, Lima RAG. Causes of hospitalization in the National
452 Healthcare System of children aged zero to four in Brazil. *Rev Bras Epidemiol*. 2010;13: 1-9.
453
- 454 29. Jansson LT, Kling S, Dallman PR. Anemia in children with acute infections seen in a primary
455 care pediatric outpatient clinic. *Pediatr Infect Dis*. 1986;5: 424-427.
456
- 457 30. Jonker FA, Boele van Hensbroek M. Anaemia, iron deficiency and susceptibility to infections. *J*
458 *Infect*. 2014;69: S23-S27.
459
- 460 31. Villalpando S, Pérez-Expósito AB, Shamah-Levy T, Rivera JA. Distribution of anemia
461 associated with micronutrient deficiencies other than iron in a probabilistic sample of Mexican
462 children. *Ann Nutr Metab*. 2006;50: 506–511.
463

- 464 32. World Health Organization. Use of multiple micronutrient powders for point-of-use fortification
465 of foods consumed by infants and young children aged 6-23 months and children aged 2-12 years.
466 Geneva: World Health Organization; 2016.

4.3 ARTIGO 3

Serum folate and vitamin B12 status in young Brazilian children

(Artigo original em fase de preparação)

Este manuscrito analisou o estado nutricional de folato e vitamina B12 e o efeito combinado dessas vitaminas no risco para anemia nas crianças do GC do ENFAC. A partir da identificação de um grande número de crianças com elevada concentração de folato sérico, com valores muito superiores aos encontrados em outros estudos realizados no Brasil e no mundo, buscou-se também identificar os principais fatores associados às altas concentrações de folato nessa amostra de crianças.

Para esta investigação, foram consideradas todas as crianças do GC do ENFAC com dados disponíveis dessas duas vitaminas, totalizando uma amostra de 460 crianças de 11 a 15 meses de idade.

Dentre os principais achados deste estudo destaca-se que 15% das crianças apresentavam deficiência de vitamina B12 e menos de 1% apresentaram deficiência de folato. Surpreendentemente, 30,9% das crianças apresentavam concentrações séricas de folato acima dos valores máximos detectáveis pelo kit comercial utilizado nas análises bioquímicas. A combinação entre altas concentrações de folato sérico (≥ 50.1 nmol/L) e vitamina B12 ≥ 148 pmol/L reduziu a frequência de anemia nas crianças estudadas enquanto que as altas concentrações de folato e baixas concentrações de vitamina B12 não foram associadas com a anemia nesse estudo. A deficiência de vitamina B12 foi inversamente associada ao risco para as altas concentrações de folato sérico.

Diante desses achados, sugere-se que mais estudos sejam realizados para avaliar as causas e o impacto de altas concentrações de folato nas concentrações séricas de vitamina B12 em crianças e os potenciais efeitos adversos que essa condição possa causar a médio e longo prazo.

1 **Title:** Serum folate and vitamin B12 status in young Brazilian children

2

3 **Authors' names:** Lara L. S. Silva¹, Wafaie W. Fawzi², Marly A. Cardoso¹ for the ENFAC
4 Working Group

5

6 ¹ Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
7 (Avenida Dr. Arnaldo 715, São Paulo, SP, 01246-904, Brazil).

8 ² Department of Global Health and Population, Harvard T.H. Chan School of Public Health (677
9 Huntington Avenue, Boston, United States).

10

11 **Corresponding author:** Marly Augusto Cardoso, Department of Nutrition, School of Public
12 Health, University of São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo 715, São Paulo, SP, 01246-904, Brazil.
13 Email: marlyac@usp.br. Telephone: (+5511) 94951-9770. Fax: (+5511) 3061-7130.

14

15 **Short title:** *Folate and vitamin B12 status in young children*

16

17 **Acknowledgements:** The authors thank the families and health professionals as well as their
18 research team members for their collaboration in the present study.

19

20 **Financial Support:** The present study was funded by the Ministry of Health of Brazil with
21 administrative and financial management by the Brazilian National Counsel of Technological and
22 Scientific Development, CNPq (Grant number 552747/2011-4). L.L.S.S. received Sandwich
23 Doctorate scholarship from the CNPq (Grant number 200487/2015-9) and currently receives
24 doctoral scholarship from CAPES. The views expressed in the present article are those of the
25 authors and not necessarily those of any funding agencies or others whose support is acknowledged.
26 The funders had no role in the design, analysis or writing of this article.

27

28 **Conflict of Interest:** None.

29

30 **Authorship:** L.L.S.S contributed to the data collection, conducted data analyses, participated in
31 data interpretation, and wrote the initial draft of the article; W. W. F. participated in data analysis
32 and interpretation, and was involved in the review of the article; M.A.C. supervised all study
33 protocols, was responsible for project management, participated in data analysis and interpretation,
34 and was involved in the writing of the article. All authors have critically reviewed the manuscript
35 content and have approved the final version submitted for publication.

Ethical Standards Disclosure: This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects/patients were approved by the Human Ethical Review Board of the School of Public Health, University of São Paulo, Brazil. Written informed consent was obtained from the caregivers of all children after they had been informed of the objectives, benefits and possible risks of this study. Children who were anemic or had any nutritional deficiency diagnosed during the study were referred for treatment in the health centers. This study was registered at www.ensaiosclinicos.gov.br as RBR-5ktv6b.

Appendix

Members of the ENFAC Working Group: Marly Augusto Cardoso, Rosângela Aparecida Augusto, Fernanda Cobayashi (Department of Nutrition, University of São Paulo, São Paulo, Brazil); Maria Claret C. M. Hadler, Maria do Rosário G. Peixoto (School of Nutrition, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil), Pedro Israel C. Lira, Leopoldina Augusta S. Sequeira (Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil), Pascoal Torres Muniz, Cristiéli Sérgio de Menezes Oliveira (Department of Health Sciences, Federal University of Acre, Rio Branco, Brazil), Márcia Regina Vitolo, Daniela Cardoso Tietzmann (Federal University of Health Science of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil), Márcia Maria Tavares Machado (Department of Preventive Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil) Patrícia Constante Jaime, Eduardo Augusto Fernandes Nilson, Gisele Ane Bortolini, Sara Araújo da Silva (Coordenação Geral de Alimentação e Nutrição, Ministry of Health, Brasília, Brazil).

Abstract

Objective: To assess the nutritional status of folate and vitamin B₁₂ and explore their combined effect on anaemia risk in young Brazilian children.

Design: A cross-sectional study was conducted at the primary health care centres of four Brazilian cities. Folate and vitamin B₁₂ were assessed by fluoroimmunoassay. Multilevel Poisson regression models were used to explore the combined effect of folate and vitamin B₁₂ status in relation to anaemia risk in young children.

Setting: Brazil.

Subjects: Children (*n* 460) aged 11 to 15 months.

Results: The median (interquartile range) of serum folate was 39.7 (28.8-55.3) nmol/L and only four children presented with folate deficiency (< 10 nmol/L). Surprisingly, 30.9% of children presented with serum folate concentrations above the upper limit of detectable values by the commercial kit used for biochemical analysis. The frequency of vitamin B₁₂ deficiency (< 148 pmol/L) was 15% and it was inversely associated with an increase of serum folate concentrations (*p*<0.001). Having high serum folate concentration (≥ 50.1 nmol/L) and vitamin B₁₂ ≥ 148 pmol/L significantly reduced the prevalence of anaemia in these children (Prevalence Ratio 0.53; 95% Confidence Interval 0.30-0.92).

Conclusions: High frequency of elevated serum concentrations of folate was found among young Brazilian children and 15% of them had vitamin B₁₂ deficiency. The combination of high serum folate and normal vitamin B₁₂ status was associated with a lower risk for anaemia in these children. Improvements in the current strategies to promote healthy food-based complementary feeding along with prevention and control of micronutrient deficiencies are recommended to improve children's health.

81

Introduction

Folate and vitamin B₁₂ are both part of the B complex group of vitamins and are required for biological methylation and DNA synthesis. Deficiency in these vitamins can lead to several adverse effects on health, including anaemia, neuropathy and birth defects (Mahmood, 2014, Shane, 2008).

There are several known causes of combined folate and vitamin B₁₂ deficiencies. Primarily, these disturbances occur because of insufficient dietary intake, impaired absorption and increased requirements. Vitamin B₁₂ is naturally present in animal-derived foods while folate can be found in vegetarian sources such as legumes and green leafy vegetables. In addition, folic acid, a synthetic form of folate, can be widely found in dietary supplements and fortified foods (Allen, 2008).

To provide an adequate intake of folate in highly vulnerable groups, such as pregnant and lactating women, older adults and children, several countries have adopted mandatory flour fortification with folic acid as a public health intervention (Lamers, 2011). In Brazil, this intervention became mandatory in 2004 and consists of the addition of 140 to 220 µg of folic acid/100 g of maize and wheat flours marketed in the country.

Epidemiological studies have shown a low prevalence of folate deficiency in children from countries where folic acid fortification is in place (Ng'eno et al, 2017; Cuevas-Nasu et al, 2012; Villamor et al, 2008); however, the same might not be observed for vitamin B₁₂ deficiency, which still varies greatly according to the child's age and eating practices (Bjørke-Monsen & Ueland, 2011).

In Nepal, for example, the prevalence of vitamin B₁₂ deficiency in children aged 6-23 months was 30.2%, while no children presented with folate deficiency (Ng'eno et al, 2017). In Mexico, 7.7% and 3.2% of children aged 1-6 years had vitamin B₁₂ and folate deficiencies, respectively (Cuevas-Nasu et al, 2012); while in Colombia, 1.6% of school-age children presented with vitamin B₁₂ deficiency and less than 1% folate deficiency (Villamor et al, 2008). In Brazil, a study conducted with 106 children (≤ 6 years) attended at a health care centre in a south-western city of Brazil identified that no children had folate or vitamin B₁₂ deficiencies (Barnabe et al, 2015); however, a low prevalence of folate deficiency (4.1%) with 13.6% of vitamin B₁₂ deficiency was found in a study conducted with 169 Amazonian children younger than 24 months (Cobayashi et al., 2015).

The mandatory flour fortification with folic acid in Brazil has proven to be effective in increasing serum folate concentrations in the Brazilian population (Britto et al, 2014). However, some international researchers raise questions about the harmful effects of excessive folic acid intake on one's health, especially in people with low vitamin B₁₂ status (Selhub, Rosenberg, 2016).

Among older adults, some evidence has shown that the imbalance of serum folate status and low vitamin B₁₂ status was associated with increased prevalence of anaemia and cognitive impairment. During pregnancy, this combination may increase women's predisposition to gestational diabetes and may cause insulin resistance, adiposity and low birth weight in their offspring (Paul and Selhub, 2017). In school-age children, a cohort conducted in Bogotá, Colombia identified that haemoglobin concentration was inversely associated with red blood cell (RBC) folate, especially in children with marginal and low vitamin B₁₂ status (Arsenault et al., 2009). The mechanisms that explain this association are unclear. Some researchers speculate that excess folate may interfere with vitamin B₁₂ metabolism and may worsen the functional consequences of impaired vitamin B₁₂ deficiency (Paul and Selhub, 2017).

To our knowledge, few studies have assessed the distribution of folate and vitamin B₁₂ nutritional status in young children, they tend to focus on rates of deficiency instead. In addition, no studies have assessed the association between high folate and low vitamin B₁₂ status in this age group. Thus, the objectives of this study were to assess the nutritional status of folate and vitamin B₁₂ and to explore their combined effect on anaemia risk in young Brazilian children.

Methods

Study design, settings and participants

This cross-sectional study is part of the “*Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar*” (ENFAC Study). This study was a pragmatic controlled clinical trial designed to assess the impact of multiple micronutrient powder on anaemia and nutritional deficiencies of infants seen at primary health care units in four Brazilian cities. A detailed description of the study design, sampling methodology and field procedures can be found elsewhere (Cardoso et al. 2016).

A sample size of at least 105 children in each control and intervention groups by study city was deemed minimally necessary for the trial and then increased by 30% to account for dropouts. This resulted in an anticipated 540 children in each group. Eligibility criteria comprised parental approval to participate and absence of current treatment for anaemia. Exclusion criteria included premature births (<37 weeks' gestation), twins, reported cases of HIV infection, malaria, tuberculosis or genetic haemoglobin disorders, as well as fever (> 39°C) on the day of blood sampling.

All children receiving routine paediatric care at primary health care units during data collection who met the inclusion and exclusion criteria of the study were invited to participate as a convenience study population. For the present analysis, the study sample was composed of all children from the ENFAC control group, aged 11-15 months. Overall, 543 children were invited to

151 participate; parents of 22 children (4.1%) declined participation; one child did not provide a blood
 152 sample and the blood samples of 60 children were not sufficient for folate and vitamin B₁₂
 153 laboratory analysis, resulting in a final sample of 460 children.

154

155 ***Data collection and laboratory procedures***

156 From June 2012 to January 2013, caregivers of children attending at primary health care
 157 centres were invited to participate in this study. At enrolment, trained fieldworkers applied a
 158 structured questionnaire through a face-to-face interview with each child's caregiver, to collect data
 159 on socioeconomic, environmental, demographic and maternal variables, as well as to gain
 160 information on the child's birth, infant feeding practices, supplementation and morbidities.

161 Each child's anthropometric measurements was obtained in duplicate directly by trained
 162 research assistants following standardized procedures and using calibrated equipment (Lohman,
 163 1988). Weight was measured with an electronic scale (Tanita, Tokyo, Japan, model UM-061),
 164 accurate to 10 g, and recumbent length was ascertained to the nearest 0.1 cm on a flat surface with
 165 portable infant measuring boards (Sanny model ES-2000, Los Angeles, CA, USA). The mean value
 166 of both measurements was analysed. Body mass index (BMI) was computed as weight (kg)/length
 167 (m²). Z-scores for length-for-age (HAZ) and BMI-for-age (BAZ) were calculated according to
 168 WHO guidelines (WHO, 2006). The cut-off defined for stunting was HAZ < -2 and that for
 169 overweight was BAZ > 1 (de Onis & Lobstein, 2010).

170 Venous blood samples were collected by trained technicians up to a week after the interview.
 171 They were collected in the morning on a day previously scheduled with the caregivers, after at least
 172 3 h of fasting. At the field laboratory, haemoglobin concentrations were determined on portable
 173 haemoglobinometers (Hb301; HemoCue®, Angelholm, Sweden). A separate blood sample was
 174 protected from light and centrifuged within 1 hour of collection; serum and plasma samples were
 175 separated in micro tubes and frozen at -20°C before being shipped to São Paulo on dry ice and
 176 maintained at -70°C until further analysis.

177 Serum folate and vitamin B₁₂ concentrations were measured by fluoroimmunoassay
 178 (PerkinElmer, Wallac Oy, Turku, Finland). Plasma ferritin and soluble transferrin receptor (sTfR)
 179 concentrations were measured using commercially available enzyme immunoassays (Ramco,
 180 Houston, TX, USA) and serum concentrations of retinol by HPLC methods (HP-1100 HPLC
 181 system, Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA) as previously described (Cardoso et al.
 182 2016). C-reactive protein (CRP) and alpha-1-acid glycoprotein (AGP) were determined using an
 183 IMMAGE Immunochemistry System (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The laboratory assayed
 184 internal and external blinded quality control specimens in each run. Based on the control specimens,
 185 the accuracy and interassay coefficients of variation for these analyses were within 7%.

186 Folate deficiency was defined as serum folate concentrations < 10 nmol/L (Benoist, 2008) and
 187 high folate concentration as serum folate ≥ 50.1 nmol/L (lower bound of highest tertile). Vitamin
 188 B₁₂ status was defined as normal (> 221 pmol/l), marginal (221–148 pmol/l), or low (< 148 pmol/l)
 189 (Green et al, 2017). Anaemia was defined as haemoglobin concentration < 110 g/L as established
 190 by WHO (WHO 2011). Iron deficiency was defined as plasma ferritin concentrations < 12 μ g/L
 191 and/or sTfR > 8.3 mg/L (WHO 2001). Children with serum retinol concentration < 1.05 μ mol/L
 192 were considered as having marginal vitamin A status. The concentrations of CRP > 5 mg/L and
 193 AGP > 1 g/L were considered as presence of inflammation (Thurnham et al. 2010).

194

195 *Statistical analysis*

196 Descriptive statistics were calculated as percentages for the categorical variables and as
 197 means (standard deviations) and median (interquartile range) for the continuous variables. The
 198 differences in the prevalence rates between groups were assessed using Pearson's χ^2 and Fisher's
 199 exact tests and the differences in the medians of the continuous variables were assessed using
 200 Kruskal-Wallis test.

201 To evaluate the combined effect of vitamin B₁₂ status and serum folate in relation to
 202 anaemia risk, prevalence ratios (PR) were estimated using multilevel mixed-effects Poisson
 203 regression models. Model 1 included city as clustering variable and model 2 was controlled for
 204 socio-economic, environmental, maternal and child characteristics, micronutrient deficiencies,
 205 inflammation and morbidity indicators that were associated with anaemia at $P < 0.20$ in model 1
 206 analyses.

207 In further analyses, PR was estimated to assess the factors associated with high
 208 concentration of serum folate using multilevel mixed-effects Poisson regression models. The main
 209 dichotomous dependent variable was high serum folate and the independent variables were child's
 210 sex and age; child's ethnicity (classified according to skin colour as used in the Brazilian census);
 211 maternal schooling, age and marital status; sanitary sewer, categorized as no public sewage or
 212 public sewage; number of children aged less than 5 years living in the child's house; child's birth
 213 weight; duration of breastfeeding; timing of introduction of fruits and/or vegetables, meat, beans
 214 and cereals, defined as early (< 6 months), adequate (≥ 6 months - < 8 months) and late (≥ 8
 215 months); iron, vitamin A plus D and multivitamin supplementation; stunting; overweight;
 216 hospitalization at least once in life; presence of diarrhoea, fever and wheezing in the past 15 days;
 217 presence of inflammation; anaemia; iron deficiency and marginal vitamin A status.

218 For this study, a hierarchical conceptual framework model with three levels of determination
 219 was used for selecting independent variables, as proposed by Cardoso et al. (2012). The most distal
 220 level included demographic, socioeconomic, environmental and maternal characteristics; the

intermediate level of birth variables, infant feeding practices and use of supplements; and the proximal level of anthropometric variables, reported morbidity and biochemical indicators. First, in model 1, analyses were conducted for selecting variables to be tested in multiple models ($P \leq 0.20$). Then, at each level of determination, variables were retained in the model if they were associated with the outcome at $P < 0.10$ (model 2). The predictors of high serum folate were considered if, after adjustment for potential factors at the same level and hierarchically superior levels, presented $P < 0.05$ in the final model. Missing observations were included in the multiple models by creating missing-value categories.

All analyses were performed using the statistical software package Stata version 12.0.

Results

Of the 460 children, the mean age was 13.51 (SD 1.03) months and 47.6% were female. More than half of children's mothers had more than 9 years of education. Around 65% of children were born with adequate weight and about a third of them were weaned before age 6 months. Few children were stunted (4.7%) but 37.1% already were overweight. Further characteristics are presented in Table 1.

Overall, the median (IQR) of serum folate was 39.7 (28.8-55.3) nmol/L and only four children (0.9%) presented with folate deficiency (< 10 nmol/L) (Table 2). Surprisingly, 142 (30.9%) children presented with serum folate concentrations above the upper limit of detectable values by the commercial kit used for biochemical analysis. In total, 35% of children had insufficient vitamin B₁₂ status (≤ 221 pmol/L) and it was inversely associated with an increase of serum folate concentrations ($p < 0.001$). The same was noted for anaemia: the overall frequency of anaemia (haemoglobin < 110 g/L) was 23% and it decreased by an increase of serum folate concentrations ($p < 0.001$). Six children (3.9%) presented with an imbalance of high folate status (lower bound of highest tertile) and low vitamin B₁₂ status (< 148 pmol/L) (Table 2).

Table 3 summarizes the combined effect between vitamin B₁₂ status and serum folate in relation to anaemia risk. Compared with having normal status for both vitamins, having high serum folate status alone significantly reduced the prevalence of anaemia (Prevalence Ratio [PR] 0.53; 95% Confidence Interval [CI] 0.30-0.92). No significant association was found for a combination of low vitamin B₁₂ status and normal serum folate with anaemia as well as for low vitamin B₁₂ status and high serum folate with anaemia.

The factors associated with high serum folate are presented in Table 4. In the multiple analysis, vitamin B₁₂ deficiency was negatively associated with having high folate concentrations.

256 Discussion

257 In the present study, 15% of children had vitamin B₁₂ deficiency and one third of them had
 258 marginal vitamin B₁₂ status. Comparing these findings with other studies, similar prevalence to this
 259 deficiency was reported among Amazonian children aged 6-24 months (13.6% defined as vitamin
 260 B₁₂ < 150 pmol/L) (Cobayashi et al, 2015) and among 1-year-old Mexican children (9.1%
 261 deficiency defined as vitamin B₁₂ < 203 pg/mL (equivalent to 150 pmol/L). A higher prevalence of
 262 vitamin B₁₂ deficiency was found in Nepalese children aged 6-23 months (30.2%) (Ng'eno et al,
 263 2017).

264 In infants and young children, vitamin B₁₂ deficiency is mainly due to low vitamin B₁₂
 265 maternal status during pregnancy and lactation that influences the infant's stores of this vitamin and
 266 causes a lower vitamin B₁₂ concentration from breast milk (Bjørke-Monsen & Ueland, 2011). In
 267 addition, low intake of animal source foods in complementary feeding and malabsorption of vitamin
 268 B₁₂ due to intestinal parasite infection can also cause deficiency in young children (Bjørke-Monsen
 269 & Ueland, 2011; Jones et al, 2007).

270 In contrast to the observations of vitamin B₁₂ deficiency in this study, less than 1% of
 271 children had folate deficiency. This low frequency of folate deficiency is consistent with other
 272 studies carried out in Brazil (Barnabe et al, 2015; Cobayashi et al., 2015) and in other developing
 273 countries, such as Colombia, Mexico and Nepal (Villamor et al, 2008; Cuevas-Nasu et al, 2012;
 274 Ng'eno et al, 2017). The lack of folate deficiency in these studies could be related for the most part
 275 by the folic acid fortification of staple foods in place in these countries. Several studies have shown
 276 that this strategy has the potential to increase folate intake in the entire population (Lawrence et al,
 277 2009) and, consequently, the serum folate concentrations (Britto et al, 2014). A review of 47
 278 Brazilian studies showed that serum folate concentrations increased by 57% in healthy children and
 279 adolescents and by 174% in adults after the implementation of flour fortification with folic acid in
 280 Brazil (Britto et al, 2014).

281 Surprisingly, the median of serum folate concentration found in the present study (39.7
 282 nmol/L) was much higher than that found in other studies: 22.7 nmol/L in Amazonian children aged
 283 < 24 months (Cobayashi et al, 2015) and 12.4 ng/mL (28.1 nmol/L) in children younger than 6
 284 years (Barnabe et al, 2015). In addition, almost one third of children from the present study
 285 presented serum folate concentrations above the upper limit of detectable values by the commercial
 286 kit used for biochemical analysis.

287 We also found that early introduction of cereals (< 8 months of age) was positively
 288 associated with having high folate concentrations in these children, although this finding was only
 289 marginally significant (p=0.073). Although fortification of wheat and corn flours with folic acid is
 290 mandatory in Brazil, and are effective for increasing serum folate concentrations in the Brazilian

population (Britto et al, 2014), this association was undesired because of the children's age. At 1 year, children should not consume a considerable amount of farinaceous products that supposedly are increasing the folate concentrations in this population. This hypothesis corroborates with a study conducted of 446 children aged 2–3 years in Brazil, which identified that 88.1% of children consumed fortified foods and the percentage of folate intake provided by consuming ultra-processed foods was 11.3%. Moreover, 70.2% of the children presented with consumption above the RDA value for this vitamin (Sangalli et al, 2016).

Despite the known beneficial effects of high acid folic intake in reducing the risk of NTD and other congenital anomalies and, less conclusively, reducing the risk of cardiovascular disease and cancer (Colapinto et al, 2015), an increasing amount of evidence has raised concerns regarding the adverse effects of high folate concentrations on one's health, especially in individuals with marginal or deficient vitamin B₁₂ status (Paul and Selhub, 2017).

In school-age children, two studies conducted in Colombia and Guatemala have found an inverse association between haemoglobin concentration and folate status (Arsenault et al, 2009; Rogers et al, 2003). In addition, the Colombian study showed that haemoglobin concentration was inversely associated with RBC folate, especially in children with marginal or deficient vitamin B₁₂ status (Arsenault et al, 2009). In our study, contrary to these studies, haemoglobin concentration was positively associated with serum folate concentration, and having low vitamin B₁₂ and high folate status does not worsen the prevalence of anaemia in these children. Arsenault et al (2009) discussed in their paper that the associations found in those studies were due to the absence of folate deficiency in the children studied, but this explanation does not apply to our study because the frequency of folate deficiency in our children was less than 1%. However, a comparison of these findings should be made with caution for some reasons: 1) the children in the present study are younger than in those studies; 2) different indicators to assess folate status were used; 3) a higher prevalence of anaemia was found in the present study (23% versus < 7% in those studies); and 4) only six children presented with low vitamin B₁₂ and high folate in the present study.

In our analysis, compared with having normal status for both vitamins, high serum folate status alone significantly reduced the frequency of anaemia. The literature clearly presents the mechanisms by which low concentrations of folate as well as vitamin B₁₂ lead to anaemia. These vitamins are metabolically linked and the deficiency of any of these vitamins results in an inhibition of DNA synthesis within red blood cell production leading to megaloblastic anaemia (Mahmood, 2014). Thus, the high folate concentration observed in the present study is reducing the risk of anaemia in these young children

Our study has limitations that deserve mention. Because of its cross-sectional design, caution should be taken in interpreting the findings. In addition, the present study lacked a sufficient

number of individuals with high folate levels and low vitamin B₁₂ status to have statistical power to detect a difference between the groups. Despite that, it is important to mention that this study is one of the most comprehensive studies on folate and vitamin B₁₂ status in young children carried out in Brazil.

We suggest more studies assessing the distribution of folate status, rather than focusing on rates of deficiency, in young children, and further research to clarify the short- and long-term effects of high intake of folic acid in infants and young children to elucidate these complex relationships with potential adverse effects.

Conclusion

A high serum folate concentration was found among 1-year-old children in Brazil and 15% of them had vitamin B₁₂ deficiency. The combination of high serum folate and low vitamin B₁₂ status was not associated with an increase of anaemia risk in these children; however, having high serum folate status and normal vitamin B₁₂ status reduced the prevalence of anaemia. Adequate complementary feeding, periodic monitoring of nutritional status of these vitamins in this age group and reassessment of the folic acid fortification policy in Brazil are recommended to avoid possible side effects of these conditions in the future.

References

- Allen LH (2008) Causes of vitamin B12 and folate deficiency. *Food Nutr Bull* **29**, Suppl. 2, S20-34.
- Arsenault JE, Mora-Plazas M, Forero Y *et al.* (2009) Hemoglobin concentration is inversely associated with erythrocyte folate concentrations in Colombian school-age children, especially among children with low vitamin B12 status. *Eur J Clin Nutr* **63**, 842-849.
- Barnabé A, Aléssio ACM, Bittar LF *et al.* Folate, Vitamin B12 and Homocysteine status in the post-folic acid fortification era in different subgroups of the Brazilian population attended to at a public health care center. *Nutr J*. Published online: 19 February 2015. doi 10.1186/s12937-015-0006-3.
- Benoist B (2008) Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull* **29**, Suppl. 2, S238-S244.
- Bjørke-Monsen AL & Ueland PM (2011) Cobalamin status in children. *J Inherit Metab Dis* **34**, 111-119.

- 360 Britto JC, Cançado R & Guerra-Shinohara EM (2014) Concentrations of blood folate in Brazilian studies
 361 prior to and after fortification of wheat and cornmeal (maize flour) with folic acid: a review. *Brazilian Rev*
 362 *Bras Hematol Hemoter* **36**, 275–286.
- 363
- 364 Cardoso MA, Augusto RA, Bortolini GA *et al.* Effect of Providing Multiple Micronutrients in Powder
 365 through Primary Healthcare on Anemia in Young Brazilian Children: A Multicentre Pragmatic Controlled
 366 Trial. *PLoS One*. Published online: 14 March 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0151097.
- 367
- 368 Cardoso MA, Scopel KK, Muniz PT *et al.* Underlying factors associated with anemia in Amazonian
 369 children: a population-based, cross-sectional study. *PLoS One*. Published online: 4 May 2012. doi:
 370 10.1371/journal.pone.0036341.
- 371
- 372 Cobayashi F, Tomita LY, Augusto RA *et al.* (2015) Genetic and environmental factors associated with
 373 vitamin B12 status in Amazonian children. *Public Health Nutr* **18**, 2202–2210.
- 374
- 375 Colapinto CK, O'Connor DL, Sampson M *et al.* (2016) Systematic review of adverse health outcomes
 376 associated with high serum or red blood cell folate concentrations. *J Public Health (Oxf)* **38**, e84–e97.
- 377
- 378 Cuevas-Nasu L, Mundo-Rosas V, Shamah-Levy T, *et al.* (2012) Prevalence of folate and vitamin B12
 379 deficiency in Mexican children aged 1 to 6 years in a population-based survey. *Salud Publica Mex* **54**, 116-
 380 124.
- 381
- 382 de Onis M & Lobstein T (2010) Defining obesity risk status in the general childhood population: which cut-
 383 offs should we use? *Int J Pediatr Obes* **5**, 458–460.
- 384
- 385 Green R (2011) Indicators for assessing folate and vitamin B-12 status and for monitoring the efficacy of
 386 intervention strategies. *Am J Clin Nutr* **94**, 666S-672S.
- 387
- 388 Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen AL *et al.* Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primers*. Published
 389 online: 29 Jun 2017. doi: 10.1038/nrdp.2017.40.
- 390
- 391 Gupta A, Kapil U, Ramakrishnan L *et al.* (2017) Prevalence of Vitamin B12 and Folate Deficiency in School
 392 Children Residing at High Altitude Regions in India. *Indian J Pediatr* **84**, 289-293.
- 393
- 394 Jones KM, Ramirez-Zea M, Zuleta C *et al.* (2007). Prevalent vitamin B-12 deficiency in twelve-month-old
 395 Guatemalan infants is predicted by maternal B-12 deficiency and infant diet. *J Nutr* **137**, 1307–1313.
- 396
- 397 Lamers Y (2011) Folate recommendations for pregnancy, lactation, and infancy. *Ann Nutr Metab*, **59**, 32-37.

- 398 Lawrence MA, Weizhong C, Raija K *et al.* (2009) Examination of selected national policies towards
399 mandatory folic acid fortification. *Nutr Rev* **67**, S73-S78.
400
- 401 Lohman TG, Roche AF & Martorel R (1988) *Anthropometric standardization reference manual*. Illinois:
402 Human Kinetics Books.
403
- 404 Mahmood L (2014) The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency. *J Health Res Rev* **1**,
405 5-9.
406
- 407 United Nations Children's Fund (UNICEF) & Micronutrient Initiative (2004) Vitamin and mineral deficiency:
408 A Global Damage Assessment Report. https://www.unicef.org/media/files/davos_micronutrient.pdf (accessed
409 Jan 2018).
410
- 411 Ng'eno BN, Perrine CG, Whitehead Jr. RD *et al.* (2017) High Prevalence of Vitamin B12 Deficiency and no
412 Folate Deficiency in Young Children in Nepal. *Nutrients*. Published online: 17 Jan 2017. doi:
413 10.3390/nu9010072.
414
- 415 Paul L & Selhub (2017) Interaction between excess folate and low vitamin B12 status. *Mol Aspects Med* **53**,
416 43-47.
417
- 418 Rogers LM, Boy E, Miller JW *et al.* (2003) High prevalence of cobalamin deficiency in Guatemalan
419 schoolchildren: associations with low plasma holotranscobalamin II and elevated serum methylmalonic acid
420 and plasma homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* **77**, 433–440.
421
- 422 Sangalli CN, Rauber F & Vitolo MR (2016) Low prevalence of inadequate micronutrient intake in young
423 children in the south of Brazil: a new perspective. *Br J Nutr* **116**, 890-896.
424
- 425 Selhub J & Rosenberg IH (2016) Excessive folic acid intake and relation to adverse health outcome.
426 *Biochimie* **126**, 71-78.
427
- 428 Shane B (2008) Folate and vitamin B12 metabolism: Overview and interaction with riboflavin, vitamin B6,
429 and polymorphisms. *Food Nutr Bull* **29**, 5-16.
430
- 431 Thurnham DI, McCabe LD, Haldar S *et al.* (2010) Adjusting plasma ferritin concentrations to remove the
432 effects of subclinical inflammation in the assessment of iron deficiency: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **92**,
433 546–555.
434

- 435 Victora CG, Bahl R, Barros AJD *et al.* (2016) Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms,
436 and lifelong effect. *Lancet* **387**, 475–490.
437
- 438 Villamor E, Mora-Plazas M, Forero Y *et al.* (2008) Vitamin B-12 Status Is Associated with Socioeconomic
439 Level and Adherence to an Animal Food Dietary Pattern in Colombian School Children. *J Nutr* **138**, 1391-
440 1398.
441
- 442 World Health Organization (2011) *Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and*
443 *assessment of severity*. Geneva: WHO.
444
- 445 World Health Organization (2006) *WHO Child Growth Standards: length/height-for-age, weight-for-age,*
446 *weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development*. Geneva: WHO.
447
- 448 World Health Organization (2001) *Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control*. A guide for
449 programme managers. Geneva: WHO.

Table 1. Characteristics of children included in the study (n=460)

Variables	Total ¹
Age (months), mean (SD)	13.51 (1.03)
Female sex, <i>n</i> (%)	219 (47.6)
Skin colour, <i>n</i> (%)	
White	78 (17.4)
Brown	345 (77.2)
Black	24 (5.4)
Maternal education ≥ 9 years, <i>n</i> (%)	273 (60.8)
Maternal age ≤ 25 years, <i>n</i> (%)	223 (48.5)
Birth weight, <i>n</i> (%)	
< 2500 g	25 (5.5)
≥ 2500 g - < 3500g	291 (64.1)
≥ 3500 g	138 (30.4)
Breastfeeding < 6 months, <i>n</i> (%)	132 (28.9)
Stunting ² , <i>n</i> (%)	21 (4.7)
Overweight ³ , <i>n</i> (%)	161 (37.1)
Presence of inflammation ⁴ , <i>n</i> (%)	61 (14.2)

¹Totals differ from the total number of study children due to missing values;

²Defined as HAZ < -2; ³Overweight was defined as BAZ > 1 (including 'at risk of overweight', overweight and obesity); ⁴Defined as AGP > 1 g/L and CRP > 5 mg/L.

Table 2. Vitamin B₁₂ and haemoglobin status by serum folate concentrations in young Brazilian children (n=460)

	Total (n=460)	Serum folate status			p-value ¹
		1st Tertile	2nd Tertile	3rd Tertile	
		(n = 152)	(n = 152)	(n = 156)	
Serum folate (nmol/L)					
Median and IQR	39.7 (28.8 – 55.3)	25.4 (20.6 – 28.7)	39.4 (35.8 – 43.6)	55.3 (55.3 – 55.3)	<0.001
Deficiency (< 10)	4 (0.9)	-	-	-	
Serum vitamin B₁₂ (pmol/L)					
Median and IQR	274.2 (184.5 – 403.5)	245.7 (153.5 – 387.3)	226.6 (163.8 – 371.4)	325.1 (238.2 – 419.2)	<0.001
Categories					<0.001
Deficient (< 148), n (%)	69 (15.0)	33 (21.7)	30 (19.7)	6 (3.9)	
Marginal (148 – 221), n (%)	92 (20.0)	29 (19.1)	41 (27.0)	22 (14.1)	
Normal (> 221), n (%)	299 (65.0)	90 (59.2)	81 (53.3)	128 (82.0)	
Haemoglobin (g/L)					
Median and IQR	118 (110 – 126)	113.5 (106 – 122)	118 (110 – 124)	122 (115 – 128)	<0.001
<110 g/L, n (%)	106 (23.0)	54 (35.5)	33 (21.7)	19 (12.2)	<0.001

¹ Pearson χ^2 or Kruskal Wallis tests were used to examine differences in proportions and in continuous variables between folate status concentrations, respectively.

Table 3. Combined effect of vitamin B₁₂ status and serum folate in relation to anaemia risk in young Brazilian children (n=460)

Vitamin status ¹	n (%)	Prevalence of anaemia ² n (%) ³	Prevalence ratio (95% IC)	
			Model 1 ⁴	Model 2 ⁵
Normal B ₁₂ + Normal folate	241 (52.4)	64 (26.6)	Ref.	Ref.
Normal B ₁₂ + High folate	150 (32.6)	17 (11.3)	0.49 (0.29; 0.85)	0.53 (0.30; 0.92)
Low B ₁₂ + Normal folate	63 (13.7)	23 (36.5)	1.56 (0.96; 2.54)	1.48 (0.89; 2.46)
Low B ₁₂ + High folate	6 (1.3)	2 (33.3)	1.35 (0.33; 5.54)	1.83 (0.42; 7.92)

¹ Normal B₁₂ (vitamin B₁₂ ≥ 148 pmol/L); Low B₁₂ (vitamin B₁₂ < 148 pmol/L); Normal folate (serum folate < 50.1 nmol/L); High folate (serum folate ≥ 50.1 nmol/L, representing the lower bound of highest tertile of folate concentration).

² Defined as haemoglobin concentration < 110 g/L.

³ Fisher's exact test.

⁴ Multilevel Poisson regression models adjusted for city as clustering variable.

⁵ Multilevel Poisson regression models adjusted for city, maternal schooling, more than 1 children < 5 years in the house, age of introduction of fruits and/or vegetables, age of introduction of grains, use of multivitamin supplement, stunting, previous hospitalization, inflammation, iron deficiency and marginal vitamin A status (vitamin A < 105 µmol/L).

Table 4. Factors associated with high concentration of serum folate (≥ 50.1 nmol/L) among young Brazilian children (n=460)

Independent variables	n (%) ¹	Model 1 ²			Model 2 ³		
		PR (SE)	95% CI	p-value	PR (SE)	95% CI	p-value
Children < 5 y in the house							
1 child	340 (73.9)	Ref.	-	-	Ref.	-	-
> 1 child	120 (26.1)	0.77 (0.15)	0.53; 1.14	0.195	0.77 (0.15)	0.53; 1.14	0.195
Duration of breastfeeding							
< 6 months	132 (28.9)	1.42 (0.24)	1.02; 1.98	0.039	1.33 (0.24)	0.94; 1.88	0.110
≥ 6 months	325 (71.1)	Ref.	-	-	Ref.	-	-
Age of introduction of cereals							
<6 months	95 (20.7)	1.68 (0.42)	1.02; 2.76	0.040	1.54 (0.40)	0.92; 2.57	0.098
6 months - < 8 months	253 (55.1)	1.46 (0.32)	0.95; 2.23	0.081	1.48 (0.32)	0.96; 2.27	0.073
≥ 8 months	111 (24.2)	Ref.	-	-	Ref.	-	-
Iron supplementation							
Never used it	269 (59.0)	Ref.	-	-	Ref.	-	-
Has used or uses it	187 (41.0)	0.75 (0.14)	0.51; 1.08	0.124	0.83 (0.17)	0.56; 1.24	0.371
Vitamin A plus D supplementation							
Never used it	343 (75.0)	Ref.	-	-	Ref.	-	-
Has used or uses it	114 (25.0)	0.63 (0.20)	0.33; 1.18	0.149	0.67 (0.24)	0.33; 1.34	0.259
Diarrhoea in the last 15 d.							
No	345 (75.2)	Ref.	-	-	Ref.	-	-
Yes	114 (24.8)	0.64 (0.13)	0.42; 0.96	0.031	0.71 (0.15)	0.47; 1.08	0.112
Wheezing in the last 15 d.							
No	289 (62.8)	Ref.	-	-	Ref.	-	-
Yes	171 (37.2)	0.77 (0.14)	0.54; 1.09	0.141	0.81 (0.15)	0.57; 1.15	0.236
Anaemia ⁴							
No	354 (77.0)	Ref.	-	-	Ref.	-	-

Yes	106 (23.0)	0.49 (0.12)	0.30; 0.81	0.005	0.62 (0.16)	0.37; 1.02	0.061
Marginal vitamin A status ⁵							
No	298 (64.8)	Ref.	-	-	Ref.	-	-
Yes	162 (35.2)	0.72 (0.13)	0.50; 1.02	0.063	0.84 (0.15)	0.59; 1.21	0.350
Vitamin B ₁₂ deficiency ⁶							
No	391 (85.0)	Ref.	-	-	Ref.	-	-
Yes	69 (15.0)	0.22 (0.09)	0.10; 0.49	<0.001	0.25 (0.10)	0.11; 0.57	0.001

¹Totals differ from the total number of study children due to missing values.

²Multilevel Poisson regression model adjusted for city (clustering variable).

³Multilevel Poisson regression model adjusted for city (clustering variable) and variables that were associated with the outcome at $P < 0.10$ following a hierarchical conceptual framework model.

⁴Defined as haemoglobin <110 g/L.

⁵Defined as vitamin A <1.05 $\mu\text{mol/L}$.

⁶Defined as vitamin B₁₂ <148 pmol/L.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização de estudos epidemiológicos que identifiquem a prevalência de distúrbios nutricionais na população infantil, assim como que avaliem estratégias para sua prevenção e controle são essenciais para a formulação e implementação de políticas em nutrição em saúde pública no país. A presente tese de doutorado avaliou o impacto da fortificação caseira com MNP no estado nutricional de vitamina A, a frequência de anemia e o estado nutricional de folato e vitamina B12 em crianças atendidas em unidades básicas de saúde em quatro cidades brasileiras em diferentes regiões do país.

Na primeira investigação desta tese, foi identificado que a fortificação caseira com vitaminas e minerais em pó melhorou o estado nutricional de vitamina A e reduziu a prevalência da deficiência dessa vitamina em crianças menores de dois anos de idade. Além disso, foi observado que essa intervenção foi efetiva na redução da DVA independente da vigência do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A.

Dada a elevada prevalência da DVA no país e diante da discussão sobre a efetividade da suplementação com megadoses de vitamina A nos dias atuais, principalmente em relação à redução da DVA subclínica em crianças, os achados desta tese mostram que a fortificação caseira com MNP pode ser uma estratégia complementar ao conjunto de ações para prevenção e controle dessa deficiência na primeira infância e constitui um dado relevante na tomada de decisão política em relação ao futuro desse Programa no país.

Outro fato que se destaca na fortificação caseira é a efetividade dessa estratégia na prevenção e controle da anemia em crianças. Em outro estudo com dados do ENFAC, CARDOSO et al. (2016) identificaram que a fortificação caseira com MNP também foi efetiva na redução da anemia e DF, o que ressalta ainda mais a importância dessa estratégia no Brasil visando a prevenção das duas principais carências de micronutrientes em crianças menores de dois anos no país.

Dentre as estratégias utilizadas para a prevenção e controle da anemia e das deficiências de micronutrientes na infância, a fortificação da alimentação infantil com MNP se destaca por melhorar a oferta de vitaminas e minerais na alimentação complementar, importante para atender a elevada demanda desses micronutrientes nessa fase da vida. Uma vez que os sachês devem ser adicionados diretamente na alimentação da criança, em papas de frutas, legumes ou no arroz e feijão, os profissionais de saúde têm a oportunidade de promover uma alimentação complementar adequada e saudável durante a orientação sobre o uso dos sachês.

No que tange a investigação sobre a frequência de anemia nas crianças do grupo controle do ENFAC (artigo 2 desta tese) em cenário de saúde infantil vigente antes da intervenção com MNP, observou-se que a anemia continua a ser um grave problema de saúde pública em crianças brasileiras menores de dois anos. E por se tratar de crianças usuárias de UBS, essa situação se agrava, uma vez que as principais ações de prevenção e controle da anemia na infância têm sido realizadas no contexto da ABS. Esse achado reforça a importância da continuidade da avaliação periódica dos atuais programas de prevenção e controle da anemia no país, o que, felizmente, vinha sendo realizado nos últimos anos, e a necessidade da discussão acerca de intervenções complementares voltadas à prevenção e controle de morbidades infecciosas na infância.

Diante de escassos estudos que avaliam outras deficiências de micronutrientes em crianças brasileiras, a presente tese também contribuiu na investigação do estado nutricional de folato e vitamina B12 em crianças atendidas na ABS. A deficiência de vitamina B12 foi observada em 15% das crianças do grupo controle do ENFAC, enquanto a deficiência de folato foi praticamente inexistente. Em contrapartida, observou-se altas concentrações séricas de folato em cerca de 30% dessas crianças, despertando preocupação sobre a atual estratégia de fortificação compulsória de farinhas de trigo e milho com folato e a necessidade de melhorar o monitoramento do estado nutricional desse micronutriente nessa população, apesar dessas altas concentrações terem sido associadas ao menor risco de anemia nas crianças do grupo controle do ENFAC.

Em conclusão, os achados desta tese evidenciam que a fortificação caseira com MNP é efetiva na redução da prevalência de DVA em crianças de um ano assistidas

na ABS e que essa intervenção pode integrar um conjunto de estratégias voltadas à prevenção e controle dessa deficiência no país. Além disso, pelo sinergismo dessa estratégia com a promoção de uma alimentação complementar saudável, sugere-se que seja uma estratégia importante para prevenção e controle da anemia e da deficiência de outros micronutrientes na infância.

Destaca-se que a fortificação caseira com MNP pode compor a Estratégia Amamenta e Alimenta Brasil, que é uma das ações do Ministério da Saúde para a promoção do aleitamento materno e da alimentação saudável nos primeiros dois anos de vida, incentivando a utilização de preparações culinárias com alimentos regionais, minimamente processados, excluindo o consumo de produtos alimentícios ultraprocessados, conforme recomendações do Guia Alimentar para a População Brasileira. Essas estratégias em conjunto certamente potencializarão a redução da ocorrência de agravos importantes à saúde na infância como a anemia e a deficiência de micronutrientes.

6 REFERÊNCIAS

Allen L, Benoist B, Dary O, Hurrell R. Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva: World Health Organization; 2006.

Arsenault JE, Mora-Plazas M, Forero Y, Lopez-Arana S, Baylin A, Villamor E. Hemoglobin concentration is inversely associated with erythrocyte folate concentrations in Colombian school-age children, especially among children with low vitamin B12 status. *Eur J Clin Nutr*. 2009;63:842-849.

Assunção MCF, Santos IS, Barros AJD, Gigante DP, Victora CG. Flour fortification with iron has no impact on anaemia in urban Brazilian children. *Public Health Nutr*. 2012;15(10):1796-1801.

Azevedo MMS, Cabral PC, Diniz AS, Fisberg M, Fisberg RM, Arruda IKG. Deficiência de vitamina A em pré-escolares da cidade do Recife, Nordeste do Brasil. *Arch Latinoam Nutr*. 2010;60(1):36-41.

Bailey RL, West Jr KP, Black RE. The Epidemiology of Global Micronutrient Deficiencies. *Ann Nutr Metab*. 2015;66(suppl 2):22-33.

Balarajan Y, Ramakrishnan U, Ozaltin E, Shankar AH, Subramanian SV. Anaemia in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 2011;378(9809):2123-35.

Barros ALA, Soares ADN, Pessoa MC, Teixeira RA, Beininger MA. Deficiência de vitamina A em crianças residentes na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev Min Enferm*. 2010;14(3):386-93.

Bhaskaram P. Micronutrient Malnutrition, Infection, and Immunity: An Overview. *Nutr Rev*. 2002;60(5):S40-5.

Bhutta ZA, Ahmed T, Black RE, Cousens S, Dewey K, Giugliani E, Haider BA, Kirkwood B, Morris SS, Sachdev HPS, Shekar M, for the Maternal and Child Undernutrition Study Group. What works? Interventions for maternal and child undernutrition and survival. *Lancet* 2008;371(9610):417-40.

Black MM, Quigg AM, Hurley KM, Pepper MR. Iron deficiency and iron-deficiency anemia in the first two years of life: strategies to prevent loss of developmental potential. *Nutr Rev*. 2011;69(suppl 1):S64-70.

Boy E, Mannar V, Pandav C, de Benoist B, Viteri F, Fontaine O, Hotz C. Achievements, challenges, and promising new approaches in vitamin and mineral deficiency control. *Nutr Rev*. 2009;67(suppl 1):S24-30.

Brasil. Ministério da Saúde. Vitamina A—módulo gerador de relatórios [internet]. 2017d [acesso em 05 set 2017]. Disponível em:

http://dabsistemas.saude.gov.br/sistemas/vitaminaA/relatorio_publico/vita_relatorio.php

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 150, de 13 de abril de 2017 que dispõe sobre o enriquecimento das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico. 2017a [acesso em 18 out 2017] Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=37&data=17/04/2017>

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 344, de 13 de dezembro de 2002 que regulamenta a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. 2002b. [acesso em 19 out 2017]. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_344_2002_COMP.pdf/b4d87885-dcb9-4fe3-870d-db57921cf73f

Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil em síntese [internet]. 2017b [acesso em 05 set 2017]. Disponível em <https://cidades.ibge.gov.br/v4>

Brasil. Ministério da Saúde. Dez passos para uma alimentação saudável para crianças brasileiras menores de dois anos. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Guia Alimentar para Crianças Menores de 2 Anos. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2002a. [acesso em 10 jan 2015]. Disponível em <http://www.redeblh.fiocruz.br/media/guiaaliment.pdf>

Brasil. Ministério da Saúde. Informação e gestão da Atenção Básica – e-Gestor: cobertura da Atenção Básica. 2017c [internet]. [acesso em 05 set 2017]. Disponível em <https://egestorab.saude.gov.br/paginas/acessoPublico/relatorios/relHistoricoCoberturaAB.xhtml>

Brasil. Ministério da Saúde. NutriSUS–Estratégia de fortificação da alimentação infantil com micronutrientes (vitaminas e minerais) em pó: manual operacional. 2015b. [acesso em 18 out 2017]. Disponível em http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/manual_operacional_nutrisus.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da criança e da mulher: Relatório Final. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. [acesso em 18 out 2017]. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnds_crianca_mulher.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Alimentação e Nutrição. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2012b. 84p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia Alimentar para a população brasileira. 2ª ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Carências de Micronutrientes. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2007. [acesso em 10 jan 2015]. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cadernos_atencao_basica_carencias_micronutrientes.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual de Condutas Gerais do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2013b.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual de Condutas Gerais do Programa Nacional de Suplementação de Ferro. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2013a.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Estratégia Nacional para Promoção do Aleitamento Materno e Alimentação Complementar Saudável no Sistema Único de Saúde: manual de implementação. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2015a.

Brasil. Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome (MDS). Marco de referência de educação alimentar e nutricional para as políticas públicas. Brasília (DF): MDS; Secretaria Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional; 2012a.

Cardoso MA, Augusto RA, Bortolini GA, Oliveira CSM, Tietzman DC, Sequeira LAS, et al. Effect of Providing Multiple Micronutrients in Powder through Primary Healthcare on Anemia in Young Brazilian Children: A Multicentre Pragmatic Controlled Trial. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151097.

Cardoso MA, Scopel KK, Muniz PT, Villamor E, Ferreira UM. Underlying factors associated with anemia in Amazonian children: a population-based, cross-sectional study. *PLoS One*. 2012;7(5):e36341.

Cediel G, Olivares M, Brito A, Romaña DL, Cori H, La Frano MR. Interpretation of Serum Retinol Data From Latin America and the Caribbean. *Food Nutr Bull*. 2015; 36(Suppl 2):S98-108.

Cembranel F, Dallazen C, González-Chica DA. Efetividade da suplementação de sulfato ferroso na prevenção da anemia em crianças: revisão sistemática da literatura e metanálise. *Cad Saúde Pública*. 2013;29(9):1731-51.

Cribb VL, Northstone K, Hopkins D, Emmett PM. Sources of Vitamin A in the Diets of Pre-School Children in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Nutrients*. 2013;5(5):1609-21.

De-Regil LM, Suchdev PS, Vist GE, Walleiser S, Peña-Rosas, JP. Home fortification of foods with multiple micronutrient powders for health and nutrition in children under two years of age. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;7:1-84.

Dewey KG. The challenge of meeting nutrient needs of infants and young children during the period of complementary feeding: an evolutionary perspective. *J Nutr*. 2013;143(12):2050-4.

Fernandes TFS, Diniz AS, Cabral PC, Oliveira RS, Lóla MMF, Silva SMM, et al. Hipovitaminose A em pré-escolares de creches públicas do Recife: indicadores bioquímico e dietético. *Rev Nutr*. 2005;18(4):471-80.

Fishman SM, Christian P, West KP. The role of vitamins in the prevention and control of anemia. *Public Health Nutr*. 2000;3:1225-50.

Garcia MT, Granado FS, Cardoso MA. Alimentação complementar e estado nutricional de crianças menores de dois anos atendidas no Programa Saúde da Família em Acrelândia, Acre, Amazônia Ocidental Brasileira. *Cad Saúde Pública*. 2011;27(2):305-16.

Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B-12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Am J Clin Nutr* 2011;94(2):666S–72S.

Greiner T. Vitamin A: Moving the food-based approach forward ICN2 Expert Papers. 2013. [acesso em 19 out 2017]. Disponível em <http://www.fao.org/3/as565e.pdf>

HFTAG - Home Fortification Technical Advisory Group. Frequently Asked Questions. [acesso em 12 dez 2017]. Disponível em http://www.hftag.org/page.asp?content_id=33987

HFTAG - Home Fortification Technical Advisory Group. Guidelines and specifications for defining the micronutrient composition of single serve sachets for specified target populations in low- and middle-income countries with high prevalence of anaemia and micronutrient deficiencies. 2013. [acesso em 3 nov 2017]. Disponível em: https://www.dsm.com/content/dam/dsm/nip/en_US/documents/HFTAG%20MNP%20Composition%20Manual.pdf.

Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman TB. *Designing Clinical Research*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

IOM - Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington (DC); 2001. [acesso em 19 out 2015]. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK222310/>

Jack SJ, Ou K, Chea M, Chhin L, Devenish R, Dunbar M, et al. Effect of micronutrient sprinkles on reducing anemia: a cluster-randomized effectiveness trial. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2012;166:842-50.

Jordão RE, Bernardi JLD, Barros Filho A. Prevalência de anemia ferropriva no Brasil: uma revisão sistemática. *Rev Paul Pediatr* 2009;27:90-8.

Kapil U, Sachdev HPS. Massive dose vitamin A programme in India - Need for a targeted approach. *Indian J Med Res.* 2013;138:411-17.

Kraemer K, Zimmermann MB. Nutritional anemia. Switzerland: Sight and Life; 2007.

Kyriazi VI. A holistic approach of erythropoiesis and iron in anemia. *Health Science Journal* 2011; 5(3):176-81.

Latham M. The great vitamin A fiasco. *World Nutrition.* 2010;1(1):12-45.

Lobo LMC. Fatores relacionados aos níveis de retinol sérico em crianças de seis a 24 meses de creches municipais de Goiânia-Goiás [dissertação]. Goiânia: Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás; 2013.

Lohman TG, Roche AF, Martorel R. Anthropometric standardization reference manual. Illinois: Human Kinetics Books; 1988.

Lozoff B, Kaciroti N, Walter T. Iron deficiency in infancy: applying a physiologic framework for prediction. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(6):1412–1421.

Martins MC, Santos LMP, Assis AMO. Prevalence of hypovitaminosis A among preschool children from northeastern Brazil, 1998. *Rev Saúde Pública.* 2004;38(4):1-6.

Mason J, Greiner T, Shrimpton R, Sanders D, Yukich J. Vitamin A policies need rethinking. *Int J Epidemiol.* 2015; 44(1):283-92.

Mclaren DS, Kraemer K. Manual on Vitamin A Deficiency Disorders (VADD). Switzerland: Sight and Life Press; 2012.

McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993–2005. *Public Health Nutr.* 2009;12(4):444–54.

Miglioli TC, Fonseca VM, Gomes Junior SC, Lira PIC, Batista-Filho M. Deficiência de Vitamina A em mães e filhos no Estado de Pernambuco. *Ciênc Saúde Coletiva.* 2013;18(5):1427-40.

Milagres RCRM, Nunes LC, Pinheiro-Sant'ana HM. A deficiência de vitamina A em crianças no Brasil e no mundo. *Ciênc Saúde Coletiva* [online]. 2007;12(5):1253-66.

Miller M, Humphrey J, Johnson E, Marinda E, Brookmeyer R, Katz J. Why Do Children Become Vitamin A Deficient? *J Nutr.* 2002;132:2867S-80S.

Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:193–200.

Netto MP, Priore SE, Sant’Ana HMP, Peluzio MCG, Sabarense CM, Franceschini SCC. Fatores associados à concentração de retinol sérico em lactentes. *Rev Paul Pediatr.* 2012;30(1):27-34.

Neufeld LM, Baker S, Garrett GS, Haddad L. Coverage and Utilization in Food Fortification Programs: Critical and Neglected Areas of Evaluation. *J Nutr.* 2017;147(5):1015S-1019S.

Novaes TG, Gomes AT, Silveira KC, Souza CL, Lamounier JA, Netto MP, Capanema FD, Rocha DS. Prevalência e fatores associados com deficiência de vitamina A em crianças atendidas em creches públicas do Sudoeste da Bahia. *Rev Bras Saúde Matern Infant.* 2016;16(3):345-52.

Osório MM. Fatores determinantes da anemia em crianças. *J Pediatr (Rio J).* 2002;78(4):269-78.

Pedraza DF, Queiroz D, Paiva AA, Cunha MAL, Lima ZN. Seguridad alimentaria, crecimiento y niveles de vitamina A, hemoglobina y zinc em niños preescolares del nordeste de Brasil. *Ciênc Saúde Coletiva.* 2014;19:641-50.

Prieto MB, Cid JL. Malnutrition in the critically ill child: the importance of enteral nutrition. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8(11):4353–66.

Queiroz D, Paiva AZ, Pedraza DF, Cunha MAL, Esteves GH, Luna JG, et al. Deficiência de vitamina A e fatores associados em crianças de áreas urbanas. *Rev Saúde Pública.* 2013;47(2):248-56.

Rogers LM, Boy E, Miller JW, Green R, Sabel JC, Allen LH. High prevalence of cobalamin deficiency in Guatemalan schoolchildren: associations with low plasma holotranscobalamin II and elevated serum methylmalonic acid and plasma homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:433–40.

Saraiva BC, Soares MC, Santos LC, Pereira SC, Horta PM. Iron deficiency and anemia are associated with low retinol levels in children aged 1 to 5 years. *J Pediatr (Rio J).* 2014;90(6):593-9.

Semba RD, Bloem MW. The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56(4):271-81.

Serdula MK, Lundeen E, Nichols EK, Imanalieva C, Minbaev M, Mamyrbaeva T, et al. Effects of a large-scale micronutrient powder and young child feeding education program on the micronutrient status of children 6-24 months of age in the Kyrgyz Republic. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67:703-07.

Sherwin JC, Reacher MH, Dean WH, Ngondi J. Epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia in at-risk populations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106(4):205-14.

Silva LLS, Peixoto MRG, Hadler MCCM, Silva SA, Cobayashi F, Cardoso MA. Vitamin A status and associated factors in infants attending at Primary Health Care in Goiânia, Goiás, Brazil. *Rev Bras Epidemiol.* 2015;18(2):490-502.

Silva LLS. Estado nutricional de vitamina A em crianças de Unidades Básicas de Saúde de Goiânia-GO [dissertação]. Goiânia: Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás; 2014.

Soofi S, Cousens S, Iqbal SP, Akhund T, Khan J, Ahmed I, et al. Effect of provision of daily zinc and iron with several micronutrients on growth and morbidity among young children in Pakistan: a cluster-randomised trial. *Lancet* 2013;382:29–40.

Stephensen CB. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:167-92.

Stevens GA, Bennett JE, Hennocq Q, Lu Y, De-Regil LM, Rogers L, et al. Trends and mortality effects of vitamin A deficiency in children in 138 low-income and middle-income countries between 1991 and 2013: a pooled analysis of population-based surveys. *Lancet Glob Health.* 2015;3:e528–36.

Stoltzfus RJ, Mullany L, Black RE. Iron deficiency anaemia. In: Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Murray CJL, editors. *Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors.* Geneva: World Health Organization; 2004. p.163–210.

Suchdev PS, Ruth LJ, Woodruff BA, Mbakaya C, Mandava U, Flores-Ayala R, et al. Selling Sprinkles micronutrient powder reduces anemia, iron deficiency, and vitamin A deficiency in young children in Western Kenya: a cluster-randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2012;95:1223-30.

The Micronutrient Initiative. SickKids The Hospital for Sick children. Joint Statement by the Micronutrient Initiative, International Nutrition Foundation and the Sprinkles Global Health Initiative at Sick Kids. Home fortification with multiple micronutrients: effectively preventing iron deficiency anaemia in infants and young children. 2011. [acesso em 03 nov 2017]. Disponível em: <http://www.unhcr.org/protection/health/4b7bc9a29/home-fortification-multiple-micronutrients-effectively-preventing-iron.html>

Thurnham DI, McCabe LD, Haldar S, Wieringa FT, Northrop-Clewes CA, McCabe GP. Adjusting plasma ferritin concentrations to remove the effects of subclinical inflammation in the assessment of iron deficiency: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:546–55.

UNICEF - The United Nations Children's Fund. Annual Results Report 2016: Nutrition. 2017. [acesso em 19 out 2017]. Disponível em https://www.unicef.org/publicpartnerships/files/2016arr_nutrition.pdf

Vasconcelos AMA, Ferreira HS. Prevalência de hipovitaminose A em crianças da região semi-árida de Alagoas (Brasil). *Arch Latinoam Nutr*. 2009;56(5):152-8.

Vieira DA, Steluti J, Verly-Jr E, Marchioni DM, Fisberg RM. Brazilians's experience with iron fortification: evidence of effectiveness for reducing inadequate iron intakes with fortified flour policy. *Public Health Nutr*. 2017;20(2):363-70.

Vieira RCS, Ferreira HS. Prevalência de anemia em crianças brasileiras, segundo diferentes cenários epidemiológicos (Prevalence of anemia in Brazilian children indiferente epidemiological scenarios). *Rev Nutr*. 2010;23(3):433-44.

Villalpando S, Pérez-Expósito AB, Shamah-Levy T, Rivera JA. Distribution of Anemia Associated with Micronutrient Deficiencies Other than Iron in a Probabilistic Sample of Mexican Children. *Ann Nutr Metab*. 2006;50:506-11.

Weatherall DJ. Hemoglobinopathies Worldwide: Present and Future. *Curr Mol Med*. 2008; 8(7):592-9.

WHO – World Health Organization. Complementary feeding of young children in developing countries: a review of current scientific knowledge. Geneva: WHO; 1998.

WHO – World Health Organization. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull*. 2008;29(2):S238-44.

WHO – World Health Organization [internet]. [acesso em: 12 out 2017]. Disponível em: http://www.who.int/elena/titles/vitamina_children/en/

WHO - World Health Organization. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005. WHO Global database on vitamin A deficiency. Geneva: WHO; 2009.

WHO – World Health Organization. Guideline: Daily iron supplementation in infants and children. Geneva: WHO; 2016b.

WHO – World Health Organization. Guideline: Intermittent iron supplementation in preschool and school-age children. Geneva: WHO; 2011b.

WHO - World Health Organization. Guideline: Use of multiple micronutrient powders for point-of-use fortification of foods consumed by infants and young children aged 6–23 months and children aged 2–12 years. Geneva: WHO; 2016a.

WHO – World Health Organization. Guideline: Vitamin A supplementation in infants and children 6–59 months of age. Geneva: WHO; 2011c.

WHO - World Health Organization. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Geneva: WHO; 2011e.

WHO - World Health Organization. Indicators for assessing Vitamin A Deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes: report of a joint. Geneva: WHO; 1996.

WHO - World Health Organization. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Geneva: WHO; 2001.

WHO - World Health Organization. Serum retinol concentrations for determining the prevalence of vitamin A deficiency in populations. Geneva: WHO; 2011a.

WHO - World Health Organization. The Global Prevalence of Anemia in 2011. 2015. [acesso em 31 jul 2017]. Disponível em http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/global_prevalence_anaemia_2011/en/

WHO - World Health Organization. Use of multiple micronutrient powders for home fortification of foods consumed by infants and children 6-23 months of age. Geneva: WHO; 2011d.

WHO - World Health Organization. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Second Edition. Bangkok: WHO; 2004.

WHO – World Health Organization. WHO Child Growth Standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development. Geneva: WHO; 2006.

Zlotkin S, Antwi KY, Schauer C, Yeung G. Use of microencapsulated iron (II) fumarate sprinkles to prevent recurrence of anemia in infants and young children at high risk. Bull World Health Organ. 2003;81:108–15.

Zlotkin SH, Tondeur M. Successful approaches: Sprinkles. In: Kraemer K, Zimmermann MB. Nutritional Anemia. Switzerland: Sight and Life; 2007.

ANEXOS

Anexo 1 – Artigo escrito em co-autoria submetido para a publicação: “*Interaction of vitamin A and inflammatory status on vitamin D sufficiency at different latitudes in Brazilian young children*”

Anexo 2 – Declaração referente ao cumprimento do estágio de pesquisa realizado na *Harvard T.H. Chan School of Public Health*

Anexo 3 – Questionário de triagem

Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 5 – Questionário único do grupo controle

Anexo 6 – Questionário inicial do grupo intervenção

Anexo 7 – Questionário de seguimento de três meses

Anexo 8 – Questionário de seguimento de seis meses (avaliação final)

Anexo 9 – Questionário de coleta de sangue

Anexo 10 – Parecer de aprovação do protocolo de pesquisa

Interaction of vitamin A and inflammatory status on vitamin D sufficiency at different latitudes in Brazilian young children

Barbara H. Lourenço^{1*}, Lara L. S. Silva², Wafaie W. Fawzi³, Marly A. Cardoso⁴, for the ENFAC Working Group

Authors' affiliations:

¹ Department of Preventive Medicine, Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

² Public Health Nutrition Program, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

³ Departments of Global Health and Population, Nutrition, and Epidemiology, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, MA, United States.

⁴ Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: Barbara H. Lourenço, Department of Preventive Medicine, Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo. Rua Botucatu 740, 04023-900, São Paulo, SP, Brazil. Telephone/fax number: +55 11 5576 4876. E-mail: barbara.lourenco@unifesp.br.

Running head: Vitamins D, A and inflammation in children.

Keywords: Vitamin D, vitamin A, inflammation, latitude, young children.

Abstract

Besides sunlight exposure, other micronutrients and inflammation may affect vitamin D status. The aim of the present study was to assess sociodemographic, nutritional and health conditions associated with vitamin D sufficiency among Brazilian young children living at different latitudes. This cross-sectional analysis included 468 children aged 11-15 months from four Brazilian cities located at lower (-8.00937 and -9.974) and higher latitudes (-16.6799 and -30.0277), who participated in the control group of a multicentre pragmatic controlled trial in primary health care units. Prevalence ratios (PR; 95%CI) were estimated for factors associated with vitamin D sufficiency (≥ 50 nmol/l). Overall prevalence of vitamin D sufficiency was only 31.8%. In multiple models adjusted for child's sex, skin colour, and maternal education, children living in higher latitudes had a 37% lower prevalence of vitamin D sufficiency (95%CI: 0.48, 0.83). A 48% higher prevalence of vitamin D sufficiency was observed in children with optimal vitamin A levels (95%CI: 1.10, 2.00), but presence of inflammation (plasma α -1 acid glycoprotein >1 g/l) significantly interacted with vitamin A status in relation to vitamin D sufficiency (P for interaction <0.05). Among children with no presence of inflammation, PR for vitamin D sufficiency was 2.70 (95%CI: 1.50, 4.87) for those with optimal vitamin A levels. No association was noted between vitamins A and D in children with inflammation. Vitamin D sufficiency was positively associated with vitamin A levels, specifically in the absence of inflammation. These findings are relevant for planning public health strategies for improving vitamin D status starting in infancy.

41

Introduction

Systematic reviews have been performed to summarize vitamin D status among populations worldwide. Data compiled on 168 389 participants of all age groups from 195 studies predominantly from North America, Asia Pacific, and Europe showed that mean 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) levels were below sufficiency (<50 nmol/l) in 37.3% of the samples, with lower 25(OH)D values signalled among newborns and infants⁽¹⁾. Such scenario was confirmed by recently meta-analyzed global information on maternal and newborn vitamin D status⁽²⁾. Overall, mean 25(OH)D concentrations were sufficient for 46% of pregnant women and only 25% of newborns, but estimates were acknowledged as yet poorly defined in African, South-East Asian, and Eastern Mediterranean regions, and no study from Latin America was included in the analysis⁽²⁾.

There is indication for tracking of vitamin D status in young children in relation to maternal characteristics and 25(OH)D levels during pregnancy^(3,4). Importance of vitamin D for bone metabolism is widely known, along with increasingly recognized roles in immune response and cell differentiation, and other potential health effects related to chronic conditions such as cancer, respiratory diseases, and cardiovascular events⁽⁵⁾. Specifically during the perinatal period, three trials provided evidence on the association of maternal vitamin D supplementation with a pooled 60% reduction (95% CI 0.23, 0.71) in low birth weight occurrence, but at a low level of evidence⁽⁴⁾. Promotion of adequate vitamin D status, which is mainly influenced by sunlight exposure, along with some dietary sources and supplementation⁽⁶⁾, should therefore be sustained starting early in life to favour proper child health and development.

Of note, some of vitamin D functions seem to operate in synergy with other micronutrients, especially vitamin A⁽⁵⁾. Both vitamins share the regulation of several immune processes, with hormone-like properties and effects mediated through nuclear hormone receptors⁽⁷⁾. Previous reports have pointed out a possible modification of the relationship between vitamin D below sufficiency and infection, such as respiratory tract infections among young children, according to the vitamin A status⁽⁸⁾. In this sense, it is necessary to consider that an intimate link between vitamins and inflammatory markers works in complex ways, from deprivation of supplies to increase in losses or utilization of these micronutrients⁽⁹⁾, and particularly in lower-income regions with a double burden of malnutrition and disease in childhood⁽¹⁰⁾.

We provide an early assessment of sociodemographic, nutritional and health conditions associated with vitamin D sufficiency among Brazilian young children of up to 15 months of age, aiming to contribute with evidence for the promotion of optimal 25(OH)D status since the first years of life. Participants were selected at primary health care units from diverse latitudes and regions across the

country and, amid nutritional factors investigated, the present study appraises the potential relationship of 25(OH)D levels with vitamin A status, according to the presence of inflammation.

Experimental methods

Study design and participants. This cross-sectional analysis is part of the “Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar” (ENFAC Study). Detailed information on sampling and field procedures has been described elsewhere⁽¹¹⁾. Briefly, the ENFAC Study was a pragmatic controlled clinical trial designed to evaluate the impact of multiple micronutrients powder on anaemia and nutritional deficiencies among children seen at primary health care units in Brazil. Four cities from different regions of the country participated in data collection: Rio Branco and Olinda, located in the North and Northeast regions, at lower latitudes (-8.00937 and -9.974, respectively), and Goiânia and Porto Alegre, in the Midwest and South regions, at higher latitudes (-16.6799 and -30.0277, respectively).

Sample size in the ENFAC Study was defined as at least 105 children in each control and intervention groups by study city in the trial to detect an increase of 6 g/dL in mean haemoglobin concentrations in the intervention arm (SD 12 g/dL), as the primary outcome of interest, with a power of 0.95 and a two-sided significance level of 0.05⁽¹¹⁾. To account for dropouts, sample size was then increased by 30%, resulting 540 children expected in each control and intervention groups. For the present analysis, the study population was composed of all children from the control group receiving routine paediatric care and aged 11-15 months. Primary health care units were selected based on the largest enrolment in each city and eligibility criteria comprised parental approval to participate and absence of current treatment for anaemia. Exclusion criteria included premature births (<37 weeks' gestation), twins, reported cases of HIV infection, malaria, tuberculosis or genetic haemoglobin disorders, as well as fever (>39° C) on the day of blood sampling.

Overall, 543 children were invited to participate; parents of 22 children (4.1%) declined participation and one child did not provide a blood sample, resulting in a total sample of 520 children for the control group in the ENFAC Study. Of these, 24 children were older than 15 months of age at the time of blood collection and, for an additional 28 participants, blood samples were not sufficient for vitamin D laboratory analysis, resulting 468 children with complete data for the present analysis.

The Institutional Review Board of the School of Public Health, University of São Paulo, Brazil, approved the main study. All procedures were performed in accordance with ethical standards of the Helsinki Declaration as revised in 1983. Written consent was obtained from the caregivers of all participants. Children with nutritional deficiency diagnosed during the study were referred for

treatment in the health centres. The ENFAC study was registered at www.ensaiosclinicos.gov.br as RBR-5ktv6b.

Data collection and laboratory procedures. From June 2012 to January 2013, caregivers of children attending primary health care units were invited to participate and, at enrolment, trained fieldworkers applied a structured questionnaire in face-to-face interviews to collect data on socioeconomic, environmental, demographic, and maternal variables, as well as information on child's birth, child feeding practices, supplementation and morbidities. Children's anthropometric measurements were obtained directly by trained research assistants using standardized procedures and calibrated equipment⁽¹²⁾. Recumbent length was ascertained to the nearest 0.1 cm on a flat surface with portable infant measuring boards (Sanny model ES-2000, Los Angeles, CA, USA) and weight was measured with an electronic scale (Tanita model UM-061), accurate to 10 g. Measurements were taken in duplicate and the mean value was considered for analysis. Body mass index (BMI) was computed as weight (kg)/length (m²). BMI and length-for-age Z-scores were calculated using the WHO Child Growth Standards⁽¹³⁾.

Venous blood samples were collected by trained technicians up to a week after the interview, in the morning of a previously scheduled day and after at least 3 hours of fasting. At the field laboratory, haemoglobin concentrations were determined on portable haemoglobinometers (HemoCue Hb301, Angelholm, Sweden) and anaemia was defined as haemoglobin concentration <11 g/dL⁽¹⁴⁾. A separate blood sample was protected from light and centrifuged within 1 hour of collection; serum and plasma samples were frozen at -20°C before being shipped to São Paulo on dry ice and maintained at -70°C until further analysis, within 6 months of collection. Serum concentrations of 25(OH)D₃ and retinol were measured by HPLC methods (HP-1100 HPLC system, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), as previously described⁽¹⁵⁾. Vitamin D sufficiency was defined as ≥ 50 nmol/l⁽¹⁶⁾. Vitamin A status was classified as sufficient at serum retinol concentrations ≥ 1.05 μ mol/l and deficient at <0.70 μ mol/l⁽¹⁷⁾. Plasma ferritin (PF) and soluble transferrin receptor (sTfR) concentrations were measured with commercially available enzyme immunoassays (Ramco, Houston, TX, USA) to determine iron deficiency as PF <12 μ g/l and/or sTfR >8.3 mg/l⁽¹⁸⁾. To assess the presence of chronic inflammation⁽¹⁹⁾, α -1-acid glycoprotein (AGP) >1 g/l was determined using an IMMAGE Immunochemistry System (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The laboratory assayed internal and external blinded quality control specimens in each run. Based on the control specimens, the accuracy and interassay coefficients of variation for these analyses were within 7%.

Statistical analyses. The main dependent variable of interest was vitamin D sufficiency. Exploratory variables comprised latitude (North/Northeast region at lower latitudes and Midwest/South region at higher latitudes), child's sex, age and skin colour, maternal characteristics, birth weight, nutritional and health indicators, including duration of breastfeeding, presence of stunting or overweight, use of vitamin supplements, occurrence of diarrhoea or wheezing in the past 15 days, diagnosis of vitamin A status and other micronutrient deficiencies, and presence of inflammation.

First, we compared the distribution of these characteristics by latitude with Pearson's χ^2 or Fisher's exact tests and t tests to examine differences in proportions and in continuous variables, respectively. Differences in the prevalence of vitamin D sufficiency were further explored separately by latitude, according to the categories of the exploratory variables among participants.

Adjusted prevalence ratios (PR) and 95% confidence intervals (95% CI) for vitamin D sufficiency were estimated according to its associated factors using multiple Poisson regression models with robust variance. We considered a hierarchical conceptual framework to fit a multiple model for vitamin D sufficiency with adjustment for latitude, child's sex and skin colour, maternal education and vitamin A status. Other potential covariates were not independently associated and did not significantly affect the estimates of association with the dependent variable of interest.

We additionally evaluated adjusted PR for vitamin D sufficiency by (1) including a term of interaction between vitamin A status and presence of inflammation in the final multiple model, and (2) fitting the estimates with a variable which classified young children for a combined status of vitamin A and inflammation into four possible categories (vitamin A sufficiency without inflammation, vitamin A sufficiency with presence of inflammation, vitamin A insufficiency without inflammation, and vitamin A insufficiency with presence of inflammation). Missing observations were included in the multiple models by creating missing-value categories. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. We used Stata 11.2 (StataCorp, College Station, TX, USA) for all analyses.

Results

Among 468 children included in the present analysis, 48.3% were girls and mean age was 13.4 (SD 1.0) months. The distribution of child's skin colour and some nutritional deficiencies varied significantly according to latitude (Table 1). The North/Northeast region, at lower latitudes, presented a smaller proportion of white children (10.2%) when compared to the Midwest/South region, at higher latitudes (23.9%, $P < 0.001$). Reported vitamin A+D supplementation was more frequent at higher latitudes, occurring among 46.6% of the children (versus only 2.3% of children living at lower latitudes, $P < 0.001$), as well as vitamin A sufficiency –condition detected in 72.3% of children from

higher latitudes in comparison to 58.0% of children from lower latitudes ($P=0.001$). Notwithstanding and consistent with the incidence of sunlight in these regions, vitamin D deficiency was more prevalent in cities at higher (74.7%) than lower latitudes (60.7%, $P=0.001$).

A sufficient status of vitamin D was present in 31.8% of the study population and explored by latitude, according to sociodemographic and health characteristics, as shown in Table 2. Maternal conditions such as higher education and being married or living with a partner were positively associated with vitamin D sufficiency among children from lower latitudes. At higher latitudes, child's sex and maternal marital status were significantly related to vitamin D sufficiency. In both regions, vitamin A status was directly associated with the prevalence of vitamin D sufficiency. Birth characteristics, presence of inflammation or recent morbidities and other nutritional deficiencies were not associated with vitamin D sufficiency in these children.

In adjusted analysis (Table 3), children living at higher latitudes, in the Midwest/South, had a significant 37% lower prevalence of vitamin D sufficiency (PR 0.63; 95% CI 0.48, 0.83) than children from lower latitudes, in the North/Northeast region. Child's sex and skin colour were not significantly associated with vitamin D sufficiency in the multiple model. For children whose mothers had ≥ 9 years of education, the PR for vitamin D sufficiency was 1.30 (95% CI 0.97, 1.75). After adjustment, a significant 48% higher prevalence of vitamin D sufficiency was observed among children with optimal vitamin A levels (PR 1.48; 95% CI 1.10, 2.00), in comparison to those with vitamin A $<1.05 \mu\text{mol/l}$.

In addition, out of 437 children with complete vitamin and inflammation data, we observed that presence of inflammation significantly interacted with vitamin A status in relation to vitamin D sufficiency. Among children with no presence of inflammation (n 294), prevalence of vitamin D sufficiency was 170% higher for those with optimal vitamin A levels, $\geq 1.05 \mu\text{mol/l}$ (PR 2.70; 95% CI 1.50, 4.87; P for interaction = 0.017), independently of latitude, child's sex and skin colour, and maternal education. No significant association was noted between vitamins A and D status in children with presence of inflammation (n 143).

Further categorization of the study population in a combined status of vitamin A and inflammation was performed, with children with vitamin A $\geq 1.05 \mu\text{mol/l}$ and no presence of inflammation as the reference category. Accordingly, a significant adjusted PR of 0.37 (95% CI 0.21, 0.68) for vitamin D sufficiency was observed among children with vitamin A $<1.05 \mu\text{mol/l}$ with no presence of inflammation, as shown in Figure 1. Again, no impact in vitamin D status was detected for categories of vitamin A combined with presence of inflammation.

Discussion

In this early assessment of conditions related to vitamin D sufficiency among Brazilian children, 25(OH)D levels ≥ 50 nmol/l were found in only one-third of study participants, positively associated with living at lower latitudes. Independently of this proxy of sunlight exposure, optimal vitamin A levels contributed with a higher prevalence of vitamin D sufficiency in children up to 15 months of age, with further control for child's sex and skin colour, and maternal education. Such influence of vitamin A status on vitamin D sufficiency was no longer detectable, however, in the presence of inflammation.

Considering that meta-analyses to date have not been able to systematically include representative information on vitamin D status during the first years of life from several developing regions worldwide, our findings for vitamin D sufficiency in Brazilian young children may be compared to other individual studies with children of similar age groups from low- to middle-income countries. Among apparently healthy individuals selected from outpatient clinics of paediatric hospitals in North India and Turkey, roughly half of children aged 1–3 years and 59% of children aged 13–24 months, respectively, were considered sufficient in 25(OH)D levels^(20,21). While 64% of Iranian healthy children of 15–23 months of age attending health care centres were vitamin D sufficient in a cross-sectional investigation conducted in different urban and rural areas of the country⁽²²⁾, less than 10% of children aged 12–60 months in rural Nepal have recently exhibited 25(OH)D ≥ 50 nmol/l in a community-based study⁽²³⁾.

Despite variation in estimates of vitamin D sufficiency, all the above-mentioned assessments have been carried out in locations at around the 30th parallel north (or somewhat above). For Latin America and the Caribbean, a review with age groups throughout the lifespan suggested that vitamin D insufficiency is probably a public health concern in the region, but with undefined magnitude; for younger children, representative data were collected only from Mexico (15th–30th parallel north), where approximately one-fourth of preschoolers showed 25(OH)D concentrations < 50 nmol/l⁽²⁴⁾. In Brazil, vitamin D below sufficiency was found among 29.2% of newborns from a probabilistic cross-sectional study in the city of Viçosa (20th parallel south; n 226)⁽²⁵⁾, and among 14.6% of children < 25 months of age in a population-based cross-sectional survey in the Western Amazon area (20th parallel south; n 158)⁽²⁶⁾. In view of the skin physiology involved in the provision of vitamin D requirements for humans, latitude may be interpreted as a proxy of exposure to sunlight and ultraviolet radiation⁽⁶⁾. In this sense, our analysis remarkably included children from cities in diverse regions and latitudes of Brazil, a country with continental dimensions in the south hemisphere. Living at lower latitudes was an important factor associated with vitamin D sufficiency among generally healthy Brazilian children aged up to 15 months subscribed to primary health care units. As well described, ultraviolet radiation is

essential to the photochemical transformation of 7-dehydrocholesterol into previtamin D₃, which undergoes hydroxylations to later reach the physiologically active form of vitamin D^(5,6).

Of note, latitude distribution seemed to minimize the potential influence of skin colour on vitamin D sufficiency in the present study. In this study, as shown in Table 1, a significantly larger proportion of non-white children were living at lower latitudes in comparison to those at higher latitudes. With adjustment for latitude, however, such child characteristic did not affect the estimates for vitamin D sufficiency. Interestingly, a small study conducted in the Southeast region of Brazil with children aged 2–7 years (*n* 84) proposed a score accounting for favourable conditions for the skin synthesis of vitamin D (such as sunlight exposure, use of sunscreen, and skin colour), which was in turn positively associated with 25(OH)D concentrations⁽²⁷⁾. An ecologic meta-regression study with data mostly of adults and elderly individuals worldwide was able to detect an inverse relationship of latitude and 25(OH)D levels solely among Caucasian subjects⁽²⁸⁾.

We also found significant regional differences in practices regarding vitamin supplementation. Whereas only 2% of children residing at lower latitudes (North/Northeast regions) received supplements, caregivers of almost half of children from higher latitudes reported complying with the practice—in spite of the significantly lower prevalence of vitamin D sufficiency simultaneously detected. Differently from other reports^(29,30), vitamin D supplementation was not sustained as a major contributor to 25(OH)D status among children in our final multiple model. This may point to a variable range of factors to be acknowledged in understanding predictors and also planning actions aimed at optimizing vitamin D status since early life. Especially at more extreme patterns of social inequities, one may speculate that diverse contexts probably encompass determinants of nutritional status among environmental conditions, parental education, health knowledge and behaviours⁽³¹⁾. Our adjusted analysis suggested a role for maternal education, whose estimate was positively directed toward vitamin D sufficiency, although not statistically significant.

As hypothesized, optimal levels of vitamin A ($\geq 1.05 \mu\text{mol/l}$) were positively associated with a sufficient status of vitamin D. Previous observational studies have found correlations among micronutrient status indicators, including vitamins D and A^(32,33). Controlling for favourable conditions for skin synthesis of vitamin D, serum retinol concentrations were positively associated with 25(OH)D in cross-sectional analysis with children aged 2–7 years (*n* 84) enrolled in a governmental fortified milk program in São Paulo, Brazil⁽²⁷⁾. Vitamin A supplementation (single dose capsule of 200000 UI) was tested for its impact of physical growth in a randomized, double blind, placebo controlled trial in an urban community clinic in New Delhi, India, among children of 12–59 months of age (*n* 900). There was indication for modest improvement of weight gain specifically in the summer season⁽³⁴⁾, which

could foster some discussion on a potential relationship of vitamin A effect with predictors of vitamin D status.

We additionally explored the association between these vitamins according to inflammation. Independently of latitude, child's sex and skin colour, and maternal education, presence of inflammation significantly interacted with vitamin A status, so that no association with vitamin D sufficiency was maintained when AGP >1 g/l. A likely synergy of optimal status of these vitamins appeared mitigated by the presence of inflammation. It is known that nutrition interrelates with immune function; retinol binding protein is among serum proteins whose concentrations are rapidly reduced during infectious processes, with a logical impact on vitamin A levels⁽⁹⁾, and there are many previous evidences that corroborate this link^(9,32,35). Besides the classical actions on bone health, a recent review of trials about the impact of vitamin D supplementation for preventing infections among children under 5 years of age was performed⁽³⁶⁾, but epidemiological evidence is still of restricted quality and no benefit has been proved. At the cellular level, examination of joint effects of vitamins D and A on the regulation of immunity has in fact indicated a possible antagonistic dynamic between metabolites of these micronutrients, given that these compounds share common nuclear receptors of the retinoic X receptor family⁽⁷⁾. Characterization of larger-scale implications of specific anti-proliferative effects of vitamin D versus cytotoxic and proliferative roles of vitamin A, however, would demand a prospective design for data collection along with consideration of different levels of these vitamins' availability to the organism, which was not possible in the present cross-sectional analysis.

There are some limitations to our study. First, we did not collect data on dietary intake of vitamin D among our participants. Nevertheless, past investigations among Brazilian young children^(37,38) found poor dietary variability in conjunction with widespread nutrient deficiencies in this age group, suggesting that no major contribution to 25(OH)D levels would have arisen from food consumption. Second, time spent outdoors under sunlight exposure, clothing habits, and use of sunscreen or other types of barriers were not directly assessed, although we had information on other important parameters related to the skin synthesis of vitamin D, such as region of residence and child skin colour. Finally, we must interpret the present findings in view of the cross-sectional nature of data collection that prevents causal assumptions. Some strengths should be noticed as well. We contribute with multicentre information on vitamin D sufficiency among young children in low- to middle-income areas. Our study subjects were selected at public primary health care units across a wide range of latitudes. In a very young age group, our findings also highlight the contribution of vitamin A, according to previous exposure to inflammation, to vitamin D status.

There is an increasing amount of longitudinal data showing a relationship of gestational vitamin D and perinatal outcomes^(39,40). Overall, in our analysis a relatively small proportion (31.8%) of children had 25(OH)D $\geq$ 50 nmol/l already during their first months of life. In light of evidence for intergenerational pathways influencing vitamin D levels, there is substantial work ahead, therefore, to ensure proper status of vitamin D among young children in an important window of opportunity favouring adequate development and better health outcomes in later years.

In conclusion, vitamin D sufficiency was present in one-third of Brazilian children of up to 15 months of age from primary health care units at diverse latitudes. Independently of child's sex and skin colour, as well as maternal education, living at lower latitudes and presenting sufficient vitamin A status were positively associated with 25(OH)D levels. This potential synergy of optimal status of vitamins was not sustained in the presence of inflammation, which significantly interacted with vitamin A. Additional prospective surveys are necessary to elucidate underlying mechanisms.

Acknowledgements

The authors thank all the participants and health professionals involved in this study.

Financial support

The present study was supported by the Ministry of Health of Brazil, with administrative and financial management by the National Council of Scientific and Technological Development, CNPq (Grant no. 552747/2011-4). The views expressed herein do not necessarily reflect those of the Ministry of Health of Brazil. Organisations involved in the financial support of this work had no role in the design, analysis or writing of this article.

Conflict of interest

None.

Authorship

B. H. L. contributed with formulation of the present research question, performed statistical analyses, wrote initial version of the article, and had primary responsibility for final content; L. L. S. S. contributed with formulation of the present research question, data collection and analyses, and helped writing the article; M. A. C. designed the study, contributed with formulation of the present research question, data collection and analyses, and was involved in the review of the article; W. W. F.

contributed with data interpretation and was involved in the review of the article. All authors read and approved the final version of the article.

References

1. Hilger J, Friedel A, Herr R *et al.* (2014) A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr* **111**, 23-45.
2. Saraf R, Morton SMB, Camargo Jr CA *et al.* (2016) Global summary of maternal and newborn vitamin D status – a systematic review. *Matern Child Nutr* **12**, 647-668.
3. Marshall I, Mehta R, Ayers C *et al.* (2016) Prevalence and risk factors for vitamin D insufficiency and deficiency at birth and associated outcome. *BMC Pediatrics* **16**, 208.
4. Thorne-Lyman A & Fawzi WW (2012) Vitamin D during pregnancy and maternal, neonatal and infant health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol* **26**, Suppl. 1, 75-90.
5. Biesalski HK (2011) Vitamin D recommendations – beyond deficiency. *Ann Nutr Metab* **59**, 10-16.
6. Holick MF, Chen TC, Lu Z *et al.* (2007) Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res* **22**, Suppl. 2, V28-33.
7. Mora JR, Iwata M, von Adrian UH (2008) Vitamin effects on the immune system: vitamin A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* **8**, 685-698.
8. Linday LA, Umhau JC, Shindldecker RD *et al.* (2010) Cod liver oil, the ratio of vitamins A and D, frequent respiratory tract infections, and vitamin D deficiency in young children in the United States. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **119**, 64-70.
9. Thurnham DI (2014) Interactions between nutrition and immune function: using inflammation biomarkers to interpret micronutrient status. *Proc Nutr Soc* **73**, 1-8.
10. Victora CG & Rivera JA (2014) Optimal child growth and the double burden of malnutrition: research and programmatic implications. *Am J Clin Nutr* **100**, 1611S-1612S.
11. Cardoso MA, Augusto RA, Bortolini GA *et al.* (2016) Effect of providing multiple micronutrients in powder through primary healthcare on anemia in young Brazilian children: a multicentre pragmatic controlled trial. *Plos One* **11**, e0151097.
12. World Health Organization (1995) *Physical status: the use and interpretation of anthropometry: report of a WHO Expert Committee*. Geneva: WHO.

- 369 13. World Health Organization (2006) WHO child growth standards based on length/height, weight
370 and age. *Acta Paediatr* **450**, S76-85.
- 371 14. World Health Organization (2011) *Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and*
372 *assessment of severity*. <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf> (accessed
373 September 2017).
- 374 15. Gomes LF, Alves AF, Sevanian A *et al.* (2004) Role of beta2-glycoprotein I, LDL-, and
375 antioxidant levels in hypercholesterolemic elderly subjects. *Antioxid Redox Signal* **6**, 237-244.
- 376 16. Institute of Medicine (2011) *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D*. Washington
377 DC: National Academies Press.
- 378 17. World Health Organization (2009) *Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk*
379 *1995-2005*. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44110/1/9789241598019_eng.pdf (accessed
380 September 2017).
- 381 18. World Health Organization (2001) *Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. A*
382 *guide for programme managers*. [http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_](http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf)
383 [prevention_control.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf) (accessed September 2017).
- 384 19. Thurnham DI, McCabe JD, Haldar S *et al.* (2010) Adjusting plasma ferritin concentrations to
385 remove the effects of subclinical inflammation in the assessment of iron deficiency: a meta-
386 analysis. *Am J Clin Nutr* **92**, 546-555.
- 387 20. Angurana SK, Angurana RS, Mahajan G *et al.* (2014) Prevalence of vitamin D deficiency in
388 apparently healthy children in north India. *J Pediatr Endocr Met* **27**, 1151-1156.
- 389 21. Gülez P, Korkmaz HA, Özkök D *et al.* (2015) Factors influencing serum vitamin D concentration
390 in Turkish children residing in İzmir: a single-center experience. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* **7**,
391 294-300.
- 392 22. Olang B, Naghavi M, Bastani D *et al.* (2011) Optimal vitamin A and suboptimal vitamin D status
393 are common in Iranian infants. *Acta Paediatr* **100**, 439-444.
- 394 23. Avagyan D, Neupane SP, Gundersen TE *et al.* (2016) Vitamin D status in pre-school children in
395 rural Nepal. *Public Health Nutr* **19**, 470-476.
- 396 24. Brito A, Cori H, Olivares M *et al.* (2013) Less than adequate vitamin D status and intake in Latin
397 America and the Caribbean: a problem of unknown magnitude. *Food Nutr Bull* **34**, 52-64.
- 398 25. Prado MRMC, Oliveira FCC, Assis KF *et al.* (2015) Prevalência de deficiência de vitamina D e
399 fatores associados em mulheres e seus recém-nascidos no período pós-parto. *Rev Paul Pediatr* **33**,
400 286-293.

- 401 26. Cobayashi F, Lourenço BH, Cardoso MA (2015) 25-hydroxyvitamin D3 levels, BsmI
402 polymorphism and insulin resistance in Brazilian Amazonian children. *Int J Mol Sci* **16**, 12531-
403 12546.
- 404 27. Kurihayashi AY, Augusto RA, Escaldelai FMD *et al.* (2015) Estado nutricional de vitaminas A e
405 D em crianças participantes de programa de suplementação alimentar. *Cad Saude Publica* **31**, 531-
406 542.
- 407 28. Hagenau T, Vest R, Gissel TN *et al.* (2009) Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin
408 pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. *Osteoporos Int* **20**, 133-140.
- 409 29. Dawodu A, Zalla L, Woo JG *et al.* (2014) Heightened attention to supplementation is needed to
410 improve the vitamin D status of breastfeeding mothers and infants when sunshine exposure is
411 restricted. *Matern Child Nutr* **10**, 383-397.
- 412 30. Saggese G, Vierucci F, Boot AM *et al.* (2015) Vitamin D in childhood and adolescence: an expert
413 position statement. *Eur J Pediatr* **174**, 565-576.
- 414 31. Leroy JF, Habicht JP, Cossío TG *et al.* (2014) Maternal education mitigates the negative effects of
415 higher income on the double burden of child stunting and maternal overweight in rural Mexico. *J*
416 *Nutr* **144**, 765-770.
- 417 32. Schulze KJ, Christian P, Wu LSF *et al.* (2014) Micronutrient deficiencies are common in 6- to 8-
418 year-old children of rural Nepal, with prevalence estimates modestly affected by inflammation. *J*
419 *Nutr* **144**, 979-987.
- 420 33. Augusto RA, Cobayashi F, Cardoso MA (2015) Associations between low consumption of fruits
421 and vegetables and nutritional deficiencies in Brazilian schoolchildren. *Public Health Nutr* **18**,
422 927-935.
- 423 34. Bahl R, Bhandari N, Taneja S *et al.* (1997) The impact of vitamin A supplementation on physical
424 growth of children is dependent on season. *Eur J Clin Nutr* **51**, 26-29.
- 425 35. Lourenço BH & Cardoso MA (2014) C-reactive protein concentration predicts change in body
426 mass index during childhood. *Plos One* **9**, e90357.
- 427 36. Yakoob MY, Salam RA, Khan FR *et al.* (2016) Vitamin D supplementation for preventing
428 infections in children under five years of age. *Cochrane Database Syst Rev* **11**, CD008824.
- 429 37. Garcia MT, Granado FS, Cardoso MA (2011) Alimentação complementar e estado nutricional de
430 crianças menores de dois anos atendidas no Programa Saúde da Família em Acrelândia, Acre,
431 Amazônia Ocidental Brasileira. *Cad Saude Publica* **27**, 305-316.
- 432 38. Hilger J, Goerig T, Weber P *et al.* (2015) Micronutrient intake in healthy toddlers: a multinational
433 perspective. *Nutrients* **7**, 6938-6955.

39. Nobles CJ, Markenson G, Chasan-Taber L (2015) Early pregnancy vitamin D status and risk for adverse maternal and infant outcomes in a bi-ethnic cohort: the Behaviors Affecting Baby and You (B.A.B.Y.) Study. *Br J Nutr* **114**, 2116-2128.
40. Lykkedegn S, Beck-Nielsen SS, Sorensen GL *et al.* (2016) Vitamin D supplementation, cord 25-hydroxivitamin D and birth weight: findings from the Odense Child Cohort. *Clin Nutr*. Published online 27 October 2016. doi: 10.1016/j.clnu.2016.10.008.

Appendix

Members of the ENFAC Working Group: Marly Augusto Cardoso, Rosângela Aparecida Augusto, Fernanda Cobayashi (Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil); Maria Claret C. M. Hadler, Maria do Rosário G. Peixoto (School of Nutrition, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil); Pedro Israel C. Lira, Leopoldina Augusta S. Sequeira (Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil); Pascoal Torres Muniz, Cristiéli Sérgio de Menezes Oliveira (Department of Health Sciences, Federal University of Acre, Rio Branco, Brazil); Márcia Regina Vitolo, Daniela Cardoso Tietzmann (Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil); Márcia Maria Tavares Machado (Department of Preventive Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil); Patrícia Constante Jaime, Eduardo Augusto Fernandes Nilson, Gisele Ane Bortolini, Sara Araújo da Silva (Coordenação Geral de Alimentação e Nutrição, Ministry of Health, Brasília, Brazil).

Table 1. Characteristics of study participants by latitude.

Characteristics	Total		Lower latitudes North/Northeast		Higher latitudes Midwest/South		P*
	n	%	n	%	n	%	
Total†	468		219		249		
Sex							0.82
Female	226	48.3	107	48.9	119	47.8	
Male	242	51.7	112	51.1	130	52.2	
Age (months)							0.13
Mean	13.4		13.4		13.5		
SD	1.0		1.0		0.9		
Skin colour							<0.001
White	80	17.7	21	10.2	59	23.9	
Brown/Black	373	82.3	185	89.8	188	76.1	
Maternal education <9 years	179	39.3	82	39.1	97	39.4	0.93
Maternal age <25 years	228	48.7	117	53.4	11	44.6	0.06
Maternal marital status							0.76
Single/widowed/divorced	140	29.9	67	30.6	73	29.3	
Married/lives with partner	328	70.1	152	69.4	176	70.7	
Birth weight (g)							0.17
Mean	3242		3275		3213		
SD	484		474		492		
Breastfeeding ≥6 months	329	70.8	157	72.4	172	69.4	0.48
Length-for-age Z-score							0.19
Mean	-0.14		-0.22		-0.76		
SD	1.15		1.21		1.09		
Stunting‡	20	4.4	15	7.1	5	2.0	0.007
BMI-for-age Z-score							0.003
Mean	0.53		0.72		0.38		
SD	1.18		1.16		1.17		
Overweight§	159	35.9	84	42.2	75	30.7	0.012
Vitamin A+D supplementation	120	25.8	5	2.3	115	46.6	<0.001
Morbidities in the past 15 days							
Diarrhoea	112	24.0	58	26.6	54	21.7	0.21
Wheezing	178	38.0	83	37.9	95	38.2	0.96
Presence of inflammation¶	143	32.7	71	36.4	72	29.8	0.14
Anaemia**	107	22.9	52	23.7	55	22.1	0.67
Iron deficiency††	177	38.2	121	55.8	56	22.7	<0.001
Vitamin A sufficiency‡‡	307	65.6	127	58.0	180	72.3	0.001
Vitamin A deficiency§§	74	15.8	33	15.1	41	16.5	0.68
Vitamin D deficiency	319	68.2	133	60.7	186	74.7	0.001

*Pearson's χ^2 or Fisher's exact tests and *t* tests were used to examine differences in proportions and in continuous variables among latitudes, respectively.

†Totals may differ from the total number of participants due to missing values.

‡Defined as length-for-age Z-score <-2.

§Defined as body mass index (BMI)-for-age Z-score >1.

||Ever used or is currently using vitamin A and D supplementation.

¶Defined as α -1-acid glycoprotein >1 g/l.

**Defined as haemoglobin <11 g/dl.

††Defined as plasma ferritin <12 μ g/l or soluble transferrin receptor >8.3 mg/l.

465 ‡‡Defined as vitamin A ≥ 1.05 $\mu\text{mol/l}$.
466 §§Defined as vitamin A < 0.70 $\mu\text{mol/l}$.
467 |||Defined as vitamin D < 50 nmol/l .
468

Table 2. Prevalence of vitamin D sufficiency by latitude, according to sociodemographic and health characteristics of Brazilian young children (*n* 468).

	Prevalence of vitamin D sufficiency (≥ 50 nmol/l)					
	Lower latitudes			Higher latitudes		
	North/Northeast (<i>n</i> 219)*			Midwest/South (<i>n</i> 259)*		
	<i>n</i>	%	<i>P</i> †	<i>n</i>	%	<i>P</i> †
Total	86	39.3	-	63	25.3	-
Sex			0.58			0.04
Male	46	41.1		26	20.0	
Female	40	37.4		37	31.1	
Skin colour			0.21			0.08
White	11	52.4		10	17.0	
Brown/Black	71	38.4		53	28.2	
Maternal education			0.012			0.89
<9 years	23	28.0		24	24.7	
≥ 9 years	58	45.3		38	25.5	
Maternal age			0.59			0.37
<25 years	44	37.6		25	22.5	
≥ 25 years	42	41.2		38	27.5	
Maternal marital status			0.013			0.016
Single/widowed/divorced	18	26.9		26	35.6	
Married/lives with partner	68	44.7		37	21.0	
Birth weight			0.79			0.29
<3500 g	58	38.7		48	27.3	
≥ 3500 g	26	40.6		15	20.8	
Duration of breastfeeding			0.32			0.17
<6 months	27	45.0		15	19.7	
≥ 6 months	59	37.6		48	27.9	
Vitamin A+D supplementation			0.65			0.08
Has never used it	84	39.4		39	29.6	
Has used or is currently using it	1	20.0		23	20.0	
Diarrhoea in the past 15 days			0.51			0.56
No	61	38.1		51	26.2	
Yes	25	43.1		12	22.2	
Wheezing in the past 15 days			0.12			0.76
No	48	35.3		40	26.0	
Yes	38	45.8		23	24.2	
Presence if inflammation‡			0.11			0.55
No	45	36.3		41	24.1	
Yes	34	47.9		20	27.8	
Anaemia§			0.64			0.70
No	67	40.1		48	24.7	
Yes	19	36.5		15	27.3	
Iron deficiency			0.77			0.34
No	37	38.5		46	24.1	
Yes	49	40.5		17	30.4	
Vitamin A suficiency¶			0.023			0.15
No	28	30.4		13	18.8	
Yes	58	45.7		50	27.8	
Vitamin A deficiency**			0.06			0.035
No	78	41.9		58	27.9	
Yes	8	24.2		5	12.2	

472 *Totals may differ from the total number of participants due to missing values.
473 †Pearson χ^2 or Fisher's exact tests were used to examine differences in proportions between groups.
474 ‡Defined as α -1-acid glycoprotein >1 g/l.
475 §Defined as haemoglobin <11 g/dl.
476 ||Defined as plasma ferritin <12 μ g/l or soluble transferrin receptor >8.3 mg/l.
477 ¶Defined as vitamin A $\geq$ 1.05 μ mol/l.
478 **Defined as vitamin A <0.70 μ mol/l.
479

Table 3. Factors associated with vitamin D sufficiency among Brazilian young children (prevalence ratio, PR and 95% confidence interval, 95% CI; *n* 468).

	Vitamin D sufficiency (≥ 50 nmol/l)		
	PR	95% CI	<i>P</i>
Latitude			
Lower --North/Northeast	Ref.	-	-
Higher --Midwest/South	0.63	0.48, 0.83	0.001
Sex			
Female	Ref.	-	-
Male	1.18	0.91, 1.53	0.215
Skin colour			
White	Ref.	-	-
Brown/Black	1.21	0.82, 1.78	0.344
Maternal education			
<9 years	Ref.	-	-
≥ 9 years	1.30	0.97, 1.75	0.076
Vitamin A sufficiency			
No <1.05 $\mu\text{mol/l}$	Ref.	-	-
Yes ≥ 1.05 $\mu\text{mol/l}$	1.48	1.10, 2.00	0.010

Figure legend

Figure 1. Adjusted prevalence ratios and 95% confidence intervals for vitamin D sufficiency according to combined status of vitamin A and presence of inflammation among Brazilian young children (*n* 437).

- Ref. Vitamin A sufficiency (≥ 1.05 $\mu\text{mol/l}$) + no inflammation (AGP ≤ 1 g/l)
● Vitamin A insufficiency (< 1.05 $\mu\text{mol/l}$) + no inflammation (AGP ≤ 1 g/l)
◆ Vitamin A sufficiency (≥ 1.05 $\mu\text{mol/l}$) + inflammation (AGP > 1 g/l)
■ Vitamin A insufficiency (< 1.05 $\mu\text{mol/l}$) + inflammation (AGP > 1 g/l)

Anexo 2 – Declaração referente ao cumprimento do estágio de pesquisa realizado na *Harvard T.H. Chan School of Public Health*

SCHOOL OF PUBLIC HEALTH

Department of Global Health
and Population

Wafaie W. Fawzi, M.B.B.S., M.P.H., M.S., Dr.P.H.

Chair, Department of Global Health and Population

Richard Saltonstall Professor of Population Sciences

Professor of Nutrition, Epidemiology and Global Health

September 14, 2016

To Whom It May Concern,

I am writing to certify that Lara Livia Santos da Silva completed her visit to the Department of Global Health and Population, at the Harvard T.H. Chan School of Public Health, from September 1, 2015 to August 31, 2016. This exchange program was developed during her ongoing doctoral program in Public Health Nutrition at the University of São Paulo, Brazil, and was supported by the CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant n. 200487/2015-9).

During her visit, Lara focused on the analysis of her doctoral study data and bibliographic searches that resulted in three scientific manuscripts, two of them already submitted to a peer-reviewed journal for publication. In addition to that, she attended two courses at our Department as a guest student and participated in several seminars and meetings at this institution.

We enjoyed having Lara with us over the past year. She was always very open to feedback and was a very quick learner. She was able to read the literature and synthesize the information in a clear way, and was able to build upon the literature to advance her research questions and examine data from Brazil. She was very detail oriented and careful in her work, and was very pleasant and got along well with others here at the school. We wish her all the best on her future studies and research.

Please let me know if you have any questions.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Wafaie Fawzi".

Wafaie Fawzi

Anexo 3 – Questionário de triagem

BRASIL		FORTIFICAÇÃO CASEIRA COM VITAMINAS E MINERAIS		unicef		CNPq	
QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM							
Identificação da criança:							
Data da entrevista							
1. Entrevistador							
2. Cidade: (1) Rio Branco (2) Goiânia (3) Olinda (4) Porto Alegre							
3. Nome da UBS:							
4. UBS Tipo: (1) Saúde da Família (2) Tradicional							
5. Nome da criança:							
6. Sexo: (0) Masculino (1) Feminino							
7. Data de nascimento da criança:							
8. Idade (meses):							
9. Quem irá responder o questionário: (1) mãe biológica (2) mãe adotiva (3) pai (4) avós (5) tia (6) cuidador/babá (7) outros							
10. Nome da mãe/responsável:							
11 e 12. Telefones Residenciais :				13 a 16. Celulares:			
Informações sobre o endereço							
17. CEP:				18 e 19. Tipo logradouro (Rua, Avenida, etc):			
20. Nome do logradouro:				21. Numero:		22. Compl.	
23. Bairro:				24. Cidade:		25. Estado :	
26. A criança fez o teste do pezinho? (0) Não (1) Sim (99) NS (se "não", pular p/ Q.29 e preencher Q.27 e Q.28 c/ 88)							
27. Se sim, deu alguma alteração? (0) Não (1) Sim (88) NA (99) NS (se "não", pular p/ Q.29 e preencher Q.28 c/ 88)							
28. Se, sim, qual alteração? (1) fenilcetonúria, (2) hipotireoidismo congênito, (3) anemia falciforme (4) fibrose cística (88) NA (99) NS							
29. A criança apresenta alguma doença (crônica ou congênita)? (0) Não (1) Sim (99) NS (se não, pular para Q.32 e preencher Q30 e Q31 com 88)							
30. Se sim, qual? (1) malária (2) portadora de HIV (3) tuberculose (4) anemia (5) outra (88) NA (99) NS (Se "outra" preencher Q31, se diferente de "outra" pular para Q32 e preencher Q31 com 88)							
31. Se, outra qual?							
32. Nasceu de parto gemelar, tem irmão gêmeo? (0) Não (1) Sim (99) NS							
33. Idade gestacional (semanas) da mãe quando a criança nasceu (consultar cartão)? (1) <37 semanas (premature) (2) >=37 semanas (99) NS							
34. A criança está fazendo algum tratamento? (0) Não (1) Sim (99) NS (Se "não", pular para Q36 e preencher Q35 com 88)							
35. Se sim, qual? _____ (88) NA (99) NS							
36. Elegível? (1) Sim, para controle (2) Sim, para intervenção (3) Não elegível							

Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do Projeto: Efetividade da fortificação caseira com vitaminas e minerais na prevenção da deficiência de ferro e anemia em crianças menores de um ano: estudo multicêntrico em cidades brasileiras.

Pesquisador Responsável: Prof^a. Dra. Marly Augusto Cardoso, Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. Telefone (11) 3061-7863, email marlyac@usp.br.

Este projeto tem o objetivo de avaliar o efeito do uso de vitaminas e minerais em pó na alimentação infantil para prevenção de anemia e deficiência de ferro em crianças de 6 a 23 meses de idade.

A metodologia da pesquisa inclui entrevistas e grupo focal sobre história individual e familiar, hábitos e práticas alimentares, medidas de peso e altura de sua criança. Coleta de sangue da criança será realizada entre os 12 e 14 meses de idade para avaliação de presença de anemia, deficiência de ferro e/ou de vitaminas A, D, E, B12 e ácido fólico. Você deverá trazer sua criança pela manhã em jejum de pelo menos 3 horas, ou seja, antes de mamar ou comer ao acordar, na data a ser agendada conforme sua preferência. As crianças que ingressarem na pesquisa com idade entre 6 e 8 meses receberão 60 pequenos envelopes (saches) com vitaminas e minerais, que deverá ser acrescentado na comida ou papinhas de frutas ou verduras após estar pronta e no momento de oferecer à criança. Deverá ser acrescentado apenas um sachê por dia durante dois a três meses.

Durante a execução do projeto o desconforto esperado refere-se à coleta de sangue que utilizará profissionais treinados e material descartável. Por isso, os riscos são mínimos e comparáveis a qualquer outra coleta de sangue em laboratórios de análises clínicas. A coleta de sangue será feita na unidade de saúde ou no laboratório, conforme sua preferência. Caso prefira ir ao laboratório, você receberá dois passes de ônibus após a coleta do sangue. Caso sua criança esteja doente ou com febre no dia do exame de sangue, será marcado um novo dia para coleta do sangue.

Custos: Todos os exames de sangue serão gratuitos, ou seja, você não terá nenhum gasto.

Benefícios: Os resultados serão enviados para seu domicílio ou entregues pela equipe de pesquisadores em parceria com agentes de saúde. Os casos de crianças anêmicas e/ou com deficiências de ferro ou vitaminas receberão tratamento completo conforme orientação médica da equipe de pesquisa em parceria com profissionais de saúde da Unidade Básica de Saúde. Ao receber os resultados dos exames você receberá orientações para prevenção da anemia e/ou deficiência de ferro e de vitaminas com a alimentação.

Voluntariedade na participação: A participação na pesquisa é livre e não envolve nenhum custo, podendo retirar o seu consentimento a qualquer momento sem nenhum

prejuízo a você ou a sua criança. O presente estudo não fornecerá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela participação.

Todas as informações obtidas e os resultados das análises bioquímicas **serão mantidos em sigilo**.

Você poderá tirar todas as suas dúvidas sobre o estudo neste momento ou posteriormente com o entrevistador.

DECLARAÇÃO DO RESPONSÁVEL PELA CRIANÇA

Após ler e receber explicações sobre a pesquisa e ter meus direitos de:

1. receber resposta a qualquer pergunta e esclarecimento sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados à pesquisa;
2. retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo;
3. não ser identificado e ser mantido o caráter confidencial das informações relacionadas à privacidade.
4. procurar esclarecimentos com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, no telefone 11 3061-7779 ou Av. Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira César, São Paulo - SP, em caso de dúvidas ou notificação de acontecimentos não previstos.**

Declaro estar ciente do exposto e desejar que nome da criança sujeito da pesquisa participe da pesquisa.

Olinda/Rio Branco/Goiânia/Porto Alegre, ____ de ____ de ____ .

Nome do responsável pela criança: _____

Assinatura: _____

Eu, nome do pesquisador, declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto ao participante e/ou responsável.

_____ Data: ____/____/____.

Telefone: _____

Anexo 5 – Questionário único do grupo controle

BRASIL FORTIFICAÇÃO CASEIRA COM VITAMINAS E MINERAIS		unicef		CNPq	
QUESTIONÁRIO ÚNICO DO GRUPO CONTROLE (12 a 14 meses)					
Identificação da criança:					
Data da entrevista (dd/mm/aa):				/	/
Nome do Entrevistador:					
BLOCO 1- Dados do Centro de Pesquisa e Unidade de Saúde					
1. Cidade: (1) Rio Branco (2) Goiânia (3) Olinda (4) Porto Alegre					
2. Nome da UBS:					
3. UBS Tipo: (1) Saúde da Família (2) Tradicional					
BLOCO 2- Identificação da criança (solicitar a certidão de nascimento)					
1. Nome da criança (sem abreviações):					
2. Sexo: (0) masculino (1) feminino					
3. Data de nascimento (conferir na certidão de nascimento ou cartão da criança):					/ /
4. Quem irá responder ao questionário? (1) mãe biológica (2) mãe adotiva (3) pai (4) avós (5) vizinha (6) cuidador/babá (7) outros					
5. Nome da mãe					
6. Nome do entrevistado (preencher caso não for a mãe):					
7. RG da mãe/entrev.: 8.UF: 9.CPF:					
10. A criança mora com a mãe biológica? (0) Não (1) Sim					
11 e 12. Tel. Residenciais:			13 e 16. tel Celulares:		
Informações sobre o endereço					
17. CEP:			18 e 19. Tipo logradouro (Rua, Avenida, etc):		
20. Nome do logradouro:		21. Numero:		22. Compl.	
23. Bairro:		24. Cidade:		25.Estado:	
BLOCO 3- Dados Maternos					
1. Os dados a seguir se referem a: (1) mãe biológica (2) mãe adotiva (3) responsável					
2. Especificar nome do responsável legal (caso não seja a mãe ou o informante da Q6 Bloco2):					
3. Cidade de nascimento da mãe/resp. legal:					
4. Estado de nascimento da mãe/resp. legal:					
5. Quanto tempo a mãe/resp. mora no local (anos)? (anotar "0" se menos de 1 ano)					
6. Qual a idade da mãe/resp. (anos)? ____ anos (99) NS					
7. Cor/raça da mãe (só para biológica): (1) branca (2) negra (3) parda (4) indígena (5) amarela (6) outra (99) NS					
8. Estado civil da mãe/resp? (1) Casada/mora junto (2) Viúva (3) Solteira (4) separada (99) NS					
9. Quantidade de filhos vivos da mãe biológica: ____ (99) NS					
10 e 11. Até que série a mãe/resp. completou na escola: 10. ____ série 11. ____ grau (00) analfabeta (88) não frequentou escola, mas sabe ler e escrever (99) NS					
12. Ocupação da mãe: (1) Dona de casa (2) Trabalha fora (3) Trabalho remunerado em casa (99) NS					

BLOCO 4- Dados Socioeconômicos				
1. Quantas pessoas moram na casa? _____ (99) NS				
2. Quantos são menores de 5 anos? _____ (99) NS (incluir a criança pesquisada)				
3 e 4. Até que série o pai completou na escola: 3. _____ série 4. _____ grau (00) analfabeto (88) não frequentou escola, mas sabe ler e escrever (99) NS				
5. Ocupação do pai. (1) remunerada formal (2) remunerada Informal (3) Não trabalha/Desempregado (4) Aposentado (99) NS				
6. Cor/raça do pai biológico: (1) branca (2) negra (3) parda (4) indígena (5) amarela (6) outra (99) NS				
7. Quem é o chefe da família? (1) pai (2) mãe (3) avós (4) outro (se pai ou mãe pular para Q8)				
8 e 9. Até que série o chefe da família completou na escola? 8. _____ série 9. _____ grau (00) analfabeto (88) não frequentou escola, mas sabe ler e escrever (99) NS				
10. Ocupação do chefe de família. (1) remunerada formal (2) remunerada Informal (3) Não trabalha/Desempregado (4) Aposentado (99) NS				
11. Qual a renda total da família no último mês (sem casa decimal)?				
12. Recebe Bolsa Família? (0) não (1) sim (99) NS				
13. Se sim, quanto (valor inteiro, não usar casa decimal)? R\$ _____				
14. Recebe outros benefícios financeiros? (0) Não (1) Sim (99) NS				
15. Se sim, quanto (valor inteiro, não usar casa decimal)? R\$ _____				
16. Na casa tem luz elétrica? (0) não (1) sim, (99) NS				
17. Possui TV ? (0) não (1) sim, uma (2) sim, mais de uma (99) NS				
18. Possui aparelho de som/rádio? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS				
19. Possui banheiro com vaso sanitário? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS				
20. Possui carro próprio? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS				
21. Possui moto própria? (0) não (1) sim, uma (2) sim, mais de uma (99) NS				
22. Possui bicicleta? (0) não (1) sim, uma (2) sim, mais de uma (99) NS				
23. Possui celulares em uso? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS				
24. Possui Computador/Note funcionando? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS				
25. Possui máquina de lavar roupa? (0) não (1) sim, uma (2) sim, mais de uma (99) NS				
26. Possui geladeira? (0) não (1) sim, uma (2) sim, mais de uma (99) NS				
27. Possui freezer? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS				
28. Possui fogão? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS				
29. Possui microondas? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS				
30. Possui Vídeo cassete/ DVD? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS				
31. Possui linha de telefone fixo? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS				
32. Possui TV a cabo? (0) não (1) sim (99) NS				
33. Tem acesso a internet banda larga? (0) não (1) sim (99) NS				
34. Qual o tipo de esgotamento sanitário? (1) Rede pública (2) Fossa rudimentar (3) Fossa séptica (4) Vala/Céu aberto (99) NS				
35. De onde vem a água que a família utiliza? (1) Rede pública (2) Cisterna/água da chuva (3) Poço/Cacimba (4) Rio/igarapé (5) Outro (99) NS				
36. Qual o tratamento da água de beber? (0) não tratada (1) filtrada (2) clorada (3) fervida (4) mineral (5) outro (99) NS				

BLOCO 5- Dados da Criança		
1. A mãe (biológica) realizou pré-natal?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
2. Quantas consultas pré-natal a mãe fez na gravidez desta criança? ____ ____	(99) NS	
3. Peso ao nascer: ____ ____ ____ gramas	(9999) NS (Se não sabe preencher Q4 com 88)	
4. Peso ao nascer obtido de:	(1) Cartão da criança (2) referido pela mãe/resp (88) NA	
5. Comprimento ao nascer: ____ ____ ____ cm	(9999) NS (Se não sabe, preencher Q6 com 88)	
6. Comprimento ao nascer obtido de:	(1) Cartão da criança (2) referido pela mãe/resp (88) NA	
7. Idade gestacional: ____ ____ semanas	(99) NS	
8. Tipo de parto:	(1) Cesárea (2) Normal (3) Normal com fórceps (99) NS	
9. A criança frequenta creche?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
10. Nome da creche:		
11. Se sim, qual turno?	(1) turno integral (2) meio turno (99) NS (88) NA	
12. Idade em que entrou na creche: ____ ____ mês		
BLOCO 6- Condições de Saúde da Criança		
1. A criança foi internada alguma vez desde que nasceu?	(0) Não (1) Sim (99) NS (Se "não", preencher Q2 a Q6 com 88)	
Se sim, responder as questões abaixo		
2. Diarreia	(0) Não (1) Sim (88) Não foi internada (99) NS	
3. Pneumonia	(0) Não (1) Sim (88) Não foi internada (99) NS	
4. Bronquite	(0) Não (1) Sim (88) Não foi internada (99) NS	
5. Outro motivo?	(0) Não (1) Sim (88) Não foi internada (99) NS	
6. Se outro, qual?		
7. A criança teve episódios de diarreia nos últimos 15 dias?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
8. Se teve diarreia, qual a duração: ____ ____ dias	(88) NA (99) NS	
9. A criança apresentou febre nos últimos 15 dias?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
10. A criança apresentou tosse nos últimos 15 dias?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
11. Teve chiado no peito ou dificuldade de respirar ou cansaço?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
12. Teve algum outro problema de saúde nos últimos 15 dias?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
13. Se sim, qual?		
14. A criança já teve diagnóstico de anemia?	(0) Não (1) Sim (99) NS	

BLOCO 7. Uso de suplementos					
Nome do suplemento:	Utiliza ou utilizou?	Dose:	Frequencia:	Idade no início do uso:	Tempo de uso:
NFERRO	FERRO	DFERRO	FQFERRO	IDFERRO	TPFERRO
Ferro:	(0) nunca usou (1) sim, usou (2) sim, usa (99) NS	__ gotas (99) NS (88) NA	__ X/dia __ X/sem __ X/mês (99) NS (88) NA (calcular a freq. em mês para digitar)	__ meses (99) NS (88) NA	__ dias __ meses (99) NS (88) NA (calcular o tempo em dias para digitar)
NVITAD	VITAD	DVITAD	FQVITAD	IDVITAD	TPVITAD
Vit.A+D:	(0) nunca usou (1) sim, usou (2) sim, usa (99) NS	__ gotas (99) NS (88) NA	__ X/dia __ X/sem __ X/mês (99) NS (88) NA (calcular a freq. em mês para digitar)	__ meses (99) NS (88) NA	__ dias __ meses (99) NS (88) NA (calcular o tempo em dias para digitar)
NPVFER	PVFER	DPVFER	FQPVFER	IDPVFER	TPPVFER
Poliv. c/ ferro:	(0) nunca usou (1) sim, usou (2) sim, usa (99) NS	__ gotas (99) NS (88) NA	__ X/dia __ X/sem __ X/mês (99) NS (88) NA (calcular a freq. em mês para digitar)	__ meses (99) NS (88) NA	__ dias __ meses (99) NS (88) NA (calcular o tempo em dias para digitar)
NPVSEM	PVSEM	DPVSEM	FQPVSEM	IDPVSEM	TPPVSEM
Poliv. s/ ferro:	(0) nunca usou (1) sim, usou (2) sim, usa (99) NS	__ gotas (99) NS (88) NA	__ X/dia __ X/sem __ X/mês (99) NS (88) NA (calcular a freq. em mês para digitar)	__ meses (99) NS (88) NA	__ dias __ meses (99) NS (88) NA (calcular o tempo em dias para digitar)
NOUTRO	OUTR	DOUTR	FQOUTR	IDOUTR	TPOUTR
outro:	(0) nunca usou (1) sim, usou (2) sim, usa (99) NS	__ gotas (99) NS (88) NA	__ X/dia __ X/sem __ X/mês (99) NS (88) NA (calcular a freq. em mês para digitar)	__ meses (99) NS (88) NA	__ dias __ meses (99) NS (88) NA (calcular o tempo em dias para digitar)

BLOCO 8 - Alimentação da Criança										
1. A criança mamou no peito na primeira hora ao nascer?								(0) Não	(1) Sim	(99) NS
2. A criança ainda MAMA no peito?								(0) Não	(1) Sim	(99) NS
3. Se a criança mamou ou mama no peito, até que idade recebeu somente leite materno, sem outro alimento, nem água ou chás (preencher em dias)?										
_____ dia(s) _____ mês(es) (888) ainda recebe só LM (sem água nem chá) (999) NS										
4. Se a criança mamou no peito, mas não mama mais, até que idade MAMOU (preencher em dias)?										
_____ dia(s) _____ mês(es) (0) nunca mamou (888) ainda mama (999) NS										
Com que idade começou a receber: nas questões abaixo utilizar 888 para "não recebe" e 999 para "não sabe"										
5. Água (preencher a idade em dias no campo cinza)								_____ mês(es)	_____ dia(s)	
6. Chá (em dias)								_____ mês(es)	_____ dia(s)	
7. Fruta/suco de frutas (em dias)								_____ mês(es)	_____ dia(s)	
8. Formula Infantil (em dias)								_____ mês(es)	_____ dia(s)	
9. Leite de vaca ou de outro animal (em dias)								_____ mês(es)	_____ dia(s)	
10. Hortaliças (verduras, legumes) (em dias)								_____ mês(es)	_____ dia(s)	
11. Carnes (frango, carne ou peixe) (em dias)								_____ mês(es)	_____ dia(s)	
12. Feijões (feijão, lentilha, ervilha) (em dias):								_____ mês(es)	_____ dia(s)	
13. Cereais (farinhas, mingau, macarão, biscoitos) (em dias):								_____ mês(es)	_____ dia(s)	
BLOCO 9- Antropometria										
1. Peso mãe-bebê1 (Kg):										
2. Peso mãe-bebê2 (Kg):										
3. Peso mãe1 (Kg):										
4. Peso mãe2 (Kg):										
5. Comprimento do bebê1 (cm):										
6. Comprimento do bebê2 (cm):										

AGRADECER A COLABORAÇÃO E SE DESPEDIR DA MÃE

Anexo 6 – Questionário inicial do grupo intervenção

BRASIL FORTIFICAÇÃO CASEIRA COM VITAMINAS E MINERAIS		unicef	CNPq
QUESTIONÁRIO INICIAL DO GRUPO INTERVENÇÃO (6 a 8 meses)			
Identificação da criança			
Data da entrevista (dd/mm/aa):			
Nome do Entrevistador:			
BLOCO 1- Dados do Centro de Pesquisa e Unidade de Saúde			
1. Cidade: (1) Rio Branco (2) Goiânia (3) Olinda (4) Porto Alegre			
2. Nome da UBS:			
3. UBS Tipo: (1) Saúde da Família (2) Tradicional			
BLOCO 2- Identificação da criança (solicitar a certidão de nascimento)			
1. Nome da criança (sem abreviações):			
2. Sexo: (0) masculino (1) feminino			
3. Data de nascimento (conferir na certidão de nascimento ou cartão da criança):			
4. Quem irá responder ao questionário? (1) mãe biológica (2) mãe adotiva (3) pai (4) avós (5) tia (6) cuidador/babá (7) outros			
5. Nome da mãe			
6. Nome do entrevistado (preencher caso o informante não for a mãe):			
7. RG da mãe/entrev.: 8.UF: 9.CPF:			
10. A criança mora com a mãe biológica? (0) Não (1) Sim			
11 e 12. Tel. Residenciais:		13 a 16. tel Celulares:	
<i>Informações sobre o endereço</i>			
17. CEP:		18 e 19. Tipo logradouro (Rua, Avenida, etc):	
20. Nome do logradouro:		21. Numero:	22. Compl.
23. Bairro:		24. Cidade:	25. Estado:
BLOCO 3- Dados Maternos			
1. Os dados a seguir se referem a: (1) mãe biológica (2) mãe adotiva (3) responsável legal			
2. Especificar o nome do responsável legal (preencher caso não seja a mãe ou o informante da Q6 Bloco2):			
3. Cidade de nascimento da mãe/resp legal :			
4. Estado de nascimento da mãe/resp. legal:			
5. Quanto tempo a mãe/resp. mora no local (anos)? (0) menos de 1 ano			
6. Qual a idade da mãe/resp. (anos)? ____ anos (99) NS			
7. Cor/raça da mãe (só para mãe biológica): (1) branca (2) negra (3) parda (4) indígena (5) amarela (6) outra (99) NS			
8. Estado civil da mãe/resp.? (1) Casada/mora junto (2) Viúva (3) Solteira (4) separada (99) NS			
9. Quantidade de filhos vivos da mãe biológica: ____ (99) NS			
10 e 11. Até que série a mãe/resp. completou na escola: 10. ____ série 11. ____ grau (00) analfabeta (88) não frequentou escola, mas sabe ler e escrever (99) NS			
12. Ocupação da mãe/resp.: (1) Dona de casa (2) Trabalha fora (3) Trabalho remunerado em casa (99) NS			

BLOCO 4- Dados Socioeconômicos									
1. Quantas pessoas moram na casa? _____ (99) NS									
2. Quantos são menores de 5 anos? _____ (99) NS (incluir a criança pesquisada)									
3 e 4. Até que série o pai completou na escola: 3. _____ série 4. _____ grau (00) analfabeto (88) não frequentou escola, mas sabe ler e escrever (99) NS									
5. Ocupação do pai. (1) remunerada formal (2) remunerada informal (3) Não trabalha/Desempregado (4) Aposentado (99) NS									
6. Cor/raça do pai biológico: (1) branca (2) negra (3) parda (4) indígena (5) amarela (6) outra (99) NS									
7. Quem é o chefe da família? (1) pai (2) mãe (3) avós (4) outro (se pai ou mãe pular para Q8)									
8 e 9. Até que série o chefe da família completou na escola? 8. _____ série 9. _____ grau (00) analfabeto (88) não frequentou escola, mas sabe ler e escrever (99) NS									
10. Ocupação do chefe de família. (1) remunerada formal (2) remunerada informal (3) Não trabalha/Desempregado (4) Aposentado (99) NS									
11. Qual a renda total da família no último mês (sem casa decimal)?									
12. Recebe Bolsa Família? (0) não (1) sim (99) NS									
13. Se sim, quanto (valor inteiro, não usar casa decimal)? R\$ _____									
14. Recebe outros benefícios financeiros? (0) Não (1) Sim (99) NS									
15. Se sim, quanto (valor inteiro, não usar casa decimal)? R\$ _____									
16. Na casa tem luz elétrica? (0) não (1) sim, (99) NS									
17. Possui TV ? (0) não (1) sim, uma (2) sim, mais de uma (99) NS									
18. Possui aparelho de som/rádio? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS									
19. Possui banheiro com vaso sanitário? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS									
20. Possui carro próprio? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS									
21. Possui moto própria? (0) não (1) sim, uma (2) sim, mais de uma (99) NS									
22. Possui bicicleta? (0) não (1) sim, uma (2) sim, mais de uma (99) NS									
23. Possui celulares em uso? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS									
24. Possui Computador/Note funcionando? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS									
25. Possui máquina de lavar roupa? (0) não (1) sim, uma (2) sim, mais de uma (99) NS									
26. Possui geladeira? (0) não (1) sim, uma (2) sim, mais de uma (99) NS									
27. Possui freezer? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS									
28. Possui fogão? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS									
29. Possui microondas? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS									
30. Possui Video cassete/ DVD? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS									
31. Possui linha de telefone fixo? (0) não (1) sim, um (2) sim, mais de um (99) NS									
32. Possui TV a cabo? (0) não (1) sim (99) NS									
33. Tem acesso a internet banda larga? (0) não (1) sim (99) NS									
34. Qual o tipo de esgotamento sanitário? (1) Rede pública (2) Fossa rudimentar (3) Fossa séptica (4) Vala/Céu aberto (99) NS									
35. De onde vem a água que a família utiliza? (1) Rede pública (2) Sistema/água da chuva (3) Poço/Cacimba (4) Rio/Igarapé (5) Outro (99) NS									
36. Qual o tratamento da água de beber? (0) não tratada (1) filtrada (2) clorada (3) fervida (4) mineral (5) outro (99) NS									

BLOCO 5- Dados da Criança		
1. A mãe (biológica) realizou pré-natal?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
2. Quantas consultas pré-natal a mãe fez na gravidez desta criança? ____ ____	(99) NS	
3. Peso ao nascer: ____ ____ ____ gramas	(9999) NS (Se não sabe preencher Q4 com 88)	
4. Peso ao nascer obtido de:	(1) Cartão da criança (2) referido pela mãe/resp (88) NA	
5. Comprimento ao nascer: ____ ____ ____ cm	(9999) NS (Se não sabe, preencher Q6 com 88)	
6. Comprimento ao nascer obtido de:	(1) Cartão da criança (2) referido pela mãe/resp (88) NA	
7. Idade gestacional: ____ ____ semanas	(99) NS	
8. Tipo de parto:	(1) Cesárea (2) Normal (3) Normal com fórceps (99) NS	
9. A criança frequenta creche?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
10. Nome da creche:		
11. Se sim, qual turno?		
(1) turno integral (2) meio turno (99) NS (88) NA		
12. Idade em que entrou na creche: ____ ____ mês		
BLOCO 6- Condições de Saúde da Criança		
1. A criança foi internada alguma vez desde que nasceu?	(0) Não (1) Sim (99) NS (Se "não", preencher Q2 a Q6 com 88)	
Se sim, responder as questões abaixo		
2. Diarreia	(0) Não (1) Sim (88) Não foi intemada (99) NS	
3. Pneumonia	(0) Não (1) Sim (88) Não foi intemada (99) NS	
4. Bronquite	(0) Não (1) Sim (88) Não foi intemada (99) NS	
5. Outro motivo?	(0) Não (1) Sim (88) Não foi intemada (99) NS	
6. Se outro, qual?		
7. A criança teve episódios de diarreia nos últimos 15 dias?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
8. Se teve diarreia, qual a duração: ____ ____ dias	(88) NA (99) NS	
9. A criança apresentou febre nos últimos 15 dias?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
10. A criança apresentou tosse nos últimos 15 dias?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
11. Teve chiado no peito ou dificuldade de respirar ou cansaço?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
12. Teve algum outro problema de saúde nos últimos 15 dias?	(0) Não (1) Sim (99) NS	
13. Se sim, qual?		
14. A criança já teve diagnóstico de anemia?	(0) Não (1) Sim (99) NS	

BLOCO 7. Uso de suplementos					
Nome do suplemento:	Utiliza ou utilizou?	Dose:	Frequencia:	Idade no início do uso:	Tempo de uso:
NFERRO	FERRO	DFERRO	FQFERRO	IDFERRO	TPFERRO
Ferro:	(0) nunca usou (1) sim, usou (2) sim, usa (99) NS	__ gotas (99) NS (88) NA	__ X/dia __ X/sem __ X/mês (99) NS (88) NA (calcular a freq. em mês para digitar)	__ meses (99) NS (88) NA	__ dias __ meses (99) NS (88) NA (calcular o tempo em dias para digitar)
NVITAD	VITAD	DVITAD	FQVITAD	IDVITAD	TPVITAD
Vit.A+D:	(0) nunca usou (1) sim, usou (2) sim, usa (99) NS	__ gotas (99) NS (88) NA	__ X/dia __ X/sem __ X/mês (99) NS (88) NA (calcular a freq. em mês para digitar)	__ meses (99) NS (88) NA	__ dias __ meses (99) NS (88) NA (calcular o tempo em dias para digitar)
NPVFER	PVFER	DPVFER	FQPVFER	IDPVFER	TPPVFER
Poliv. c/ ferro:	(0) nunca usou (1) sim, usou (2) sim, usa (99) NS	__ gotas (99) NS (88) NA	__ X/dia __ X/sem __ X/mês (99) NS (88) NA (calcular a freq. em mês para digitar)	__ meses (99) NS (88) NA	__ dias __ meses (99) NS (88) NA (calcular o tempo em dias para digitar)
NPVSEM	PVSEM	DPVSEM	FQPVSEM	IDPVSEM	TPPVSEM
Poliv. s/ ferro:	(0) nunca usou (1) sim, usou (2) sim, usa (99) NS	__ gotas (99) NS (88) NA	__ X/dia __ X/sem __ X/mês (99) NS (88) NA (calcular a freq. em mês para digitar)	__ meses (99) NS (88) NA	__ dias __ meses (99) NS (88) NA (calcular o tempo em dias para digitar)
NOUTRO	OUTR	DOUTR	FQOUTR	IDOUTR	TPOUTR
outro:	(0) nunca usou (1) sim, usou (2) sim, usa (99) NS	__ gotas (99) NS (88) NA	__ X/dia __ X/sem __ X/mês (99) NS (88) NA (calcular a freq. em mês para digitar)	__ meses (99) NS (88) NA	__ dias __ meses (99) NS (88) NA (calcular o tempo em dias para digitar)

Deixar agendado a próxima entrevista: ____ / ____ / ____ Horário: ____

AGRADECER A COLABORAÇÃO E SE DESPEDIR DA MÃE

Anexo 7 – Questionário de seguimento de três meses

BRASIL		FORTIFICAÇÃO CASEIRA COM VITAMINAS E MINERAIS		unicef		CNPq	
QUESTIONÁRIO DO SEGUIMENTO DE 3 MESES							
Identificação da criança:							
Data da entrevista (dd/mm/aa):						/	/
Nome do Entrevistador:							
Cidade: (1) Rio Branco (2) Goiânia (3) Olinda (4) Porto Alegre							
BLOCO 2- Identificação da criança (solicitar a certidão de nascimento)							
1. Nome da criança (checar com base nos dados já obtidos):							
2. Sexo: (0) masculino (1) feminino							
3. Data de nascimento (checar com base nos dados já obtidos):						/	/
4. Quem irá responder ao questionário? (1) mãe biológica (2) mãe adotiva (3) pai (4) avós (5) tia (6) cuidador/babá (7) outros							
5. Nome da mãe:							
6. Nome do responsável pela criança (preencher caso não seja a mãe):							
7. Telefones para contato (conferir se ocorreu alteração):							
8. Endereço completo (conferir se ocorreu alteração):							
BLOCO 3 - Uso do Sachê do Estudo							
1. A criança consumiu os sachês do estudo? (0) Não consumiu (1) Sim, parcialmente (2) Sim, todos (99) NS							
2. Quando a criança consumiu o sachê pela última vez? (99) NS (88) NA						/	/
3. Se não consumiu ou usou parcialmente, quantos sachês sobraram? (0) não sobrou							
4. Com que frequência o sachê foi oferecido à criança do estudo? (0) diariamente (1) 4 vezes/semana (2) 2-3 vezes/semana (3) 1x/semana (4) 2-3 vezes/mês (5) não ofereceu (99) NS (88) NA							
5. Se sobrou sachê, qual o motivo para não ter usado todos? (Aguardar resposta) (2) A criança rejeitou (1) Achou que não precisava (3) Esqueceu de dar (5) Indicação médica (4) A criança teve efeitos colaterais (6) Outros (88) NA							
6. Se outro motivo, qual?							
7. A Sra observou algum problema na criança relacionado ao uso do sachê? (0) Não (1) Sim (99) NS							
8. Se sim, qual?							
9. Algum dia a criança consumiu mais de um sachê por dia? (0) Não (1) Sim (99) NS							
10. Em que preparação o sachê foi oferecido?							
11. papa salgada/comida (0) Não (1) Sim (99) NS							
12. papa de fruta (0) Não (1) Sim (99) NS							
13. mingau (0) Não (1) Sim (99) NS							
14. suco (0) Não (1) Sim (99) NS							
15. água (0) Não (1) Sim (99) NS							
16. o sachê foi utilizado com COM MAIOR FREQUÊNCIA em que tipo de preparação? (1) papa salgada/comida (2) suco (3) mingau (5) papa de fruta (6) água (7) Outro (99) NS (88) NA							
17. Se outro tipo de preparação, qual?							
18. Como foi a aceitação do sachê pela criança? (1) Ótima (2) Boa (3) Regular (4) Ruim (99) NS (88) NA							
19. Alguma outra pessoa consumiu algum sachê? (0) Não (1) Sim (99) NS							
20. Se outra pessoa consumiu, quem? (0) irmãos (1) outras crianças (2) pais (3) outras pessoas							

Agradecer a mãe e deixar agendada a próxima entrevista.

Data: ____/____/____ Horário: _____

Anexo 8 – Questionário de seguimento de seis meses (avaliação final)

FORTIFICAÇÃO CASEIRA COM VITAMINAS E MINERAIS
QUESTIONÁRIO DO SEGUIMENTO DE 6 MESES	
Identificação da criança:	<input type="text"/>
Data da entrevista (dd/mm/aa):	<input type="text"/>
Nome do Entrevistador:	<input type="text"/>
Cidade:	(1) Rio Branco (2) Goiânia (3) Olinda (4) Porto Alegre
BLOCO 2- Identificação da criança (solicitar a certidão de nascimento)	
1. Nome da criança (checar com base na triagem):	
2. Sexo: (0) masculino (1) feminino	
3. Data de nascimento (checar com base no coleta feita na triagem):	
4. Quem irá responder ao questionário? (1) mãe biológica (2) mãe adotiva (3) pai (4) avós (5) tia (6) cuidador/babá (7) outros	
5. Nome da mãe:	
6. Nome do responsável pela criança (preencher caso não seja a mãe):	
7. Telefones para contato (conferir se ocorreu alteração):	
8. Endereço completo (conferir se ocorreu alteração):	
BLOCO 3- Dados da Criança	
1. Seu filho vai à creche? (0) Não (1) Sim (99) NS	
2. Nome da creche:	
3. Se frequenta creche, qual turno? (1) turno integral (2) meio turno (99) NS (88) NA	
4. Idade em que entrou na creche: _____ mês (99) NS (88) NA	
BLOCO 4- Condições de Saúde da Criança	
1. A criança foi internada alguma vez desde que nasceu? (0) Não (1) Sim (99) NS (Se "não", preencher Q2 a Q6 com 88)	
Se sim, responder as questões abaixo	
2. Diarreia (0) Não (1) Sim (88) Não foi internada (99) NS	
3. Pneumonia (0) Não (1) Sim (88) Não foi internada (99) NS	
4. Bronquite (0) Não (1) Sim (88) Não foi internada (99) NS	
5. Outro motivo? (0) Não (1) Sim (88) Não foi internada (99) NS	
6. Outro, qual?	
7. A criança teve episódios de diarreia nos últimos 15 dias? (0) Não (1) Sim (99) NS	
8. Se teve diarreia, qual a duração: _____ dias (88) NA (99) NS	
9. A criança apresentou febre nos últimos 15 dias? (0) Não (1) Sim (99) NS	
10. A criança apresentou tosse nos últimos 15 dias? (0) Não (1) Sim (99) NS	
11. Teve chiado no peito ou dificuldade de respirar ou cansaço? (0) Não (1) Sim (99) NS	
12. Teve algum outro problema de saúde nos últimos 15 dias? (0) Não (1) Sim (99) NS	
13. Se sim, qual?	
14. A criança teve diagnóstico de anemia nos últimos 6 meses? (0) Não (1) Sim (99) NS	

BLOCO 5 - Uso do Sachê do Estudo											
1. A criança consumiu os sachês do estudo?					(0) Não consumiu (2) Sim, todos		(1) Sim, parcialmente (99) NS				
2. Quando a criança consumiu o sachê pela última vez?					(99) NS (88) NA				/	/	
3. Se não consumiu ou usou parcialmente, quantos saches sobraram? (anotar "0" para não sobrou)											
4. Com que frequência o sachê foi oferecido à criança do estudo?											
(0) diariamente (1) 4 vezes/semana (2) 2-3 vezes/semana (3) 1x/semana (4) 2-3 vezes/mês (5) não ofereceu (99) NS (88) NA											
5. Se sobrou sachê, qual o motivo para não ter usado todos? (Aguardar resposta)											
(2) A criança rejeitou (1) Achou que não precisava (3) Esqueceu de dar (5) Indicação médica (4) A criança teve efeitos colaterais (6) Outros (88) NA											
6. Se outro motivo, qual?											
7. A Sra observou algum problema na criança relacionado ao uso do sachê? (0) Não (1) Sim (99) NS (se "não" preencher Q8 com 88)											
8. Se sim, qual?											
9. Algum dia a criança consumiu mais de um sachê por dia?											
(0) Não (1) Sim (88) NA (99) NS											
10. Em que preparação o sache foi oferecido?											
11. papa salgada/comida										(0) Não	(1) Sim (88) NA (99) NS
12. papa de fruta										(0) Não	(1) Sim (88) NA (99) NS
13. mingau										(0) Não	(1) Sim (88) NA (99) NS
14. suco										(0) Não	(1) Sim (88) NA (99) NS
15. água										(0) Não	(1) Sim (88) NA (99) NS
16. o sachê foi utilizado com COM MAIOR FREQUÊNCIA em que tipo de preparação?											
(1) papa salgada/comida (2) suco (3) mingau (5) papa de fruta (6) água (7) Outro (99) NS (88) NA											
17. Se outro tipo de preparação, qual?											
18. Como foi a aceitação do sache pela criança?										(1) Ótima (2) Boa (3) Regular (4) Ruim (99) NS (88) NA	
19. Alguma outra pessoa consumiu algum sache?										(0) Não (1) Sim (99) NS	
20. Se outra pessoa consumiu, quem?										(0) irmãos (1) outras crianças (2) pais (3) outras pessoas	

BLOCO 6 - Alimentação da Criança									
1. A criança mamou no peito na primeira hora ao nascer? (0) Não (1) Sim (99) NS									
2. A criança ainda MAMA no peito? (0) Não (1) Sim (99) NS									
3. Se a criança mamou ou mama no peito, até que idade recebeu somente leite materno, sem outro alimento, nem água ou chás (preencher em dias)? _____ dia(s) _____ mês(es) (888) ainda recebe só LM (sem água nem chá) (999) NS									
4. Se a criança mamou no peito, mas não mama mais, até que idade MAMOU (preencher em dias)? _____ dia(s) _____ mês(es) (0) nunca mamou (888) ainda mama (999) NS									
Com que idade começou a receber: nas questões abaixo utilizar 888 para "não recebe" e 999 para "não sabe"									
5. Água (preencher a idade em dias no campo cinza) _____ mês(es) _____ dia(s)									
6. Chá (em dias) _____ mês(es) _____ dia(s)									
7. Fruta/suco de frutas (em dias) _____ mês(es) _____ dia(s)									
8. Formula Infantil (em dias) _____ mês(es) _____ dia(s)									
9. Leite de vaca ou de outro animal (em dias) _____ mês(es) _____ dia(s)									
10. Hortaliças (verduras, legumes) (em dias) _____ mês(es) _____ dia(s)									
11. Carnes (frango, carne ou peixe) (em dias) _____ mês(es) _____ dia(s)									
12. Feijões (feijão, lentilha, ervilha) (em dias): _____ mês(es) _____ dia(s)									
13. Cereais (farinhas, mingau, macarão, biscoitos) (em dias): _____ mês(es) _____ dia(s)									
BLOCO 7 - Antropometria									
1. Peso mãe-bebê1 (Kg):									
2. Peso mãe-bebê2 (Kg):									
3. Peso mãe1 (Kg):									
4. Peso mãe2 (Kg):									
5. Comprimento do bebê1 (cm):									
6. Comprimento do bebê2 (cm):									

AGRADECER A COLABORAÇÃO E SE DESPEDIR DA MÃE

Anexo 9 – Questionário de coleta de sangue

BRASIL		FORTIFICAÇÃO CASEIRA COM VITAMINAS E MINERAIS		unicef		CNPq	
QUESTIONÁRIO DE COLETA DE SANGUE							
Identificação da criança:							
Número da coleta de sangue:							
1. Nome do Entrevistador:							
2. Cidade: (1) Rio Branco (2) Goiânia (3) Olinda (4) Porto Alegre							
3. Nome da criança (sem abreviações):							
4. Sexo: (0) masculino (1) feminino							
5. Data de nascimento da criança:						/	
6. Nome da mãe							
7. Data em que foi agendada a coleta:						/	
8. Coletou sangue? (0) Não (1) Sim							
9. Data da realização da coleta (dd/mm/aa):						/	
10. Hora da coleta: ____ horas ____ minutos							
11. Horário em que criança comeu ou bebeu algo pela última vez? ____ horas ____ minutos							
12. Hemocue: ____ . ____ g/dL							

Anexo 10 – Parecer de aprovação do protocolo de pesquisa **COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo

OF.COEP/053/13

24 de junho de 2013.

Prezada pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, em sua 4.ª/13 Sessão Ordinária, realizada em 21/06/2013, analisou de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, o protocolo de pesquisa n.º 2291, intitulado "EFETIVIDADE DA FORTIFICAÇÃO CASEIRA COM VITAMINAS E MINERAIS NA PREVENÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE FERRO E ANEMIA EM CRIANÇAS MENORES DE UM ANO: ESTUDO MULTICÊNTRICO EM CIDADES BRASILEIRAS", do grupo III, sob responsabilidade da pesquisadora **Marly Augusto Cardoso**, considerando-o **APROVADO**. Salienta-se, ainda, que a documentação, referente às manifestações da ANVISA, deverá ser apresentada ao COEP sempre que houver alguma nova comunicação oficial em relação ao projeto.

Cabe lembrar que, de acordo com a Res. CNS 196/96, são deveres do(a) pesquisador(a): 1) Comunicar de imediato qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste Comitê de Ética em Pesquisa para dar continuidade à pesquisa; 2) Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo COEP, no caso eventual auditoria; 3) Comunicar formalmente a este Comitê por ocasião do encerramento da pesquisa; 4) Elaborar e apresentar relatórios parciais e final; 5) Justificar perante o COEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Cláudio Leone

Decano do Comitê de Ética em Pesquisa - FSP/USP

Ilm.ª Sr.ª

Prof.ª Assoc. **Marly Augusto Cardoso**
Departamento de Nutrição
Faculdade de Saúde Pública da USP

CURRÍCULO LATTES

Lara Livia Santos da Silva

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3374527511007494>
Última atualização do currículo em 09/11/2017

Lara Livia Santos da Silva é nutricionista formada pela Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás. Durante sua graduação, foi bolsista de Iniciação Científica pelo CNPq e participou de vários projetos de pesquisa na área de nutrição e saúde. Em 2014, se tornou mestre em Nutrição e Saúde pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás e iniciou o doutorado em Nutrição em Saúde Pública na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP). Foi aluna visitante no Department of Global Health and Population, Harvard School of Public Health, Boston, MA, EUA, em 2015 e 2016. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Lara Livia Santos da Silva
Nome em citações bibliográficas	SILVA, L. L. S.; SILVA, LARA LÍVIA SANTOS DA; SILVA, LARA LIVIA SANTOS DA

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2014	Doutorado em andamento em Nutrição em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. com período sanduiche em Harvard School of Public Health (Orientador: Wafae Wahib Fawzi). Título: Fortificação da alimentação complementar com múltiplos micronutrientes em pó na prevenção da anemia e no estado nutricional de vitamina A em crianças da Atenção Básica à Saúde. Orientador: ☺ Marly Augusto Cardoso. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
2012 - 2014	Mestrado em Nutrição e Saúde. Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil. Título: Estado nutricional de vitamina A em crianças de Unidades Básicas de Saúde de Goiânia-GO, Ano de Obtenção: 2014. Orientador: ☺ Maria do Rosário Gondim Peixoto. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
2007 - 2011	Graduação em Nutrição. Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil.

Formação Complementar

2016 - 2016	Nutrition and Global Health. Harvard School of Public Health, HSPH, Estados Unidos.
2015 - 2015	Health Reform in Global Perspective. Harvard School of Public Health, HSPH, Estados Unidos.
2015 - 2015	English Course for Post-graduate Students. (Carga horária: 45h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2013 - 2013	Avaliação do Consumo Alimentar e Atividade Física. (Carga horária: 3h). Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, SBAN, Brasil.
2013 - 2013	Produção Escrita e Produção Oral em Língua Inglesa. (Carga horária: 60h). Universidade Federal de Goiás, UFG, Brasil.
2008 - 2008	Padronização de medidas antropométricas. (Carga horária: 20h). Faculdade de Nutrição - UFG, FANUT-UFG, Brasil.

Marly Augusto Cardoso

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1C

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1830703022731463>
Última atualização do currículo em 30/08/2017

Marly A. Cardoso graduou-se em Nutrição (1985) pela Universidade de São Paulo (USP). Nessa mesma universidade, obteve os títulos de mestre (1992) e doutor (1995) em Ciências dos Alimentos e Livre Docente em Nutrição em Saúde Pública (2006). É Professora Titular do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública (2016). Foi chefe do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP (2012- 2014), Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública (2006-2010) e integra equipe de pesquisadores do Núcleo de Pesquisas Epidemiológicas em Nutrição e Saúde (NUPENS) da USP. Atuou como pesquisadora visitante do Departamento de Nutrição da Harvard School of Public Health (auxílio Estágio Sênior no Exterior do CNPq) e como Lemann Research Fellow do David Rockefeller Center for Latin American Studies da Universidade de Harvard (2012), Boston, EUA. Coordenou vários projetos de pesquisa (apoio Fapesp e CNPq), de pós-doutorado (PRODOC/CAPEs e CNPq) e Escola de Altos Estudos em Epidemiologia Nutricional (USP/Harvard, apoio CAPEs/Fogarty/NIH). É Editora Associada das revistas Public Health Nutrition, PLoS One, Revista de Saúde Pública e Indian Journal of Preventive Medicine, colaborando também como relatora em várias revistas nacionais e internacionais, tais como Diabetes Care, Obesity Research, PLOS ONE, British Journal of Nutrition, American Journal of Public Health, entre outros periódicos nas áreas de nutrição, epidemiologia e saúde coletiva. É membro do Comitê Científico do International Diabetes Epidemiology Group (IDEG) e membro do corpo de assessores científicos da Fapesp, CNPq e CAPEs. Concluiu 7 orientações de pós-doutorado, 7 de doutorado, 13 de mestrado, mais de 40 orientações de iniciação científica e de treinamento técnico em pesquisa. Tem experiência na área de Nutrição, com ênfase em Epidemiologia Nutricional e Saúde Pública, atuando principalmente nos seguintes temas: avaliação do estado nutricional, consumo alimentar e distúrbios nutricionais. Foi Coordenadora do Estudo Nacional de Fortificação caseira da Alimentação Complementar (ENFAC) - ensaio pragmático multicêntrico com apoio do Ministério da Saúde do Brasil, CNPq e UNICEF (2012-2014) e atualmente Coordena o Projeto MINA - Saúde e Nutrição Materno-Infantil no Acre: coorte de nascimentos em Cruzeiro do Sul (Programa Ciência sem Fronteiras CNPq 2015-2017; Auxílio Temático Fapesp 2017-2022). (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Marly Augusto Cardoso
Nome em citações bibliográficas	CARDOSO, M. A.;Cardoso, Marly A;Cardoso, Marly Augusto;Cardoso, MA;CARDOSO, M;Cardoso, Marly A.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. AV. DR. ARNALDO 715 CERQUEIRA CESAR 01246904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617863 Fax: (11) 30617130
-----------------------	--