UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
KERONLAINY SILVA SALVATTE NUNES

ESTADO NUTRICIONAL DE VITAMINA B12 E FOLATO EM CRIANÇAS BRASILEIRAS DE 6 A 59 MESES: DADOS DO ESTUDO NACIONAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO INFANTIL (ENANI-2019)

RIO DE JANEIRO
2022

KERONLAINY SILVA SALVATTE NUNES

ESTADO NUTRICIONAL DE VITAMINA B12 E FOLATO EM CRIANÇAS BRASILEIRAS DE 6 A 59 MESES: DADOS DO ESTUDO NACIONAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO INFANTIL (ENANI-2019)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito necessário para obtenção do título de **mestre em Nutrição Humana**.

Orientadora: Dayana Rodrigues Farias
Coorientadora: Paula Normando dos Reis Costa

Rio de Janeiro
Julho 2022

Nunes, Keronlainy Silva Salvatte.

Estado nutricional de vitamina B12 e folato em crianças brasileiras de 6 a 59 meses: dados do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019). / Keronlainy Silva Salvatte Nunes. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2022.

83 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Dayana Rodrigues Farias

Coorientadora: Paula Normando dos Reis Costa

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2022.

Referências: f. 77-83.

1. Estado Nutricional. 2. Deficiência de Vitamina B12. 3. Nutrição da Criança. 4. Nutrição – Tese. I. Farias, Dayana Rodrigues. II. Costa, Paula Normando dos Reis. III. UFRJ, CCS, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Andreia de Oliveira Paim CRB - 7 /5183

KERONLAINY SILVA SALVATTE NUNES

ESTADO NUTRICIONAL DE VITAMINA B12 E FOLATO EM CRIANÇAS BRASILEIRAS DE 6 A 59 MESES: DADOS DO ESTUDO NACIONAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO INFANTIL (ENANI-2019)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito necessário para obtenção do título de **mestre em Nutrição Humana**.

Aprovada em 01 de julho de 2022.

_____

Professora Drª. Dayana Rodrigues Farias
Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Nutrição Josué de Castro
Orientadora

_____

Professor Dr. Alceu Afonso Jordão Junior
Universidade de São Paulo/Curso de Nutrição e Metabolismo
Examinador

_____

Professora Drª. Patrícia de Carvalho Padilha
Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Nutrição Josué de Castro
Examinadora

_____

Professora Drª. Rosângela Alves Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Nutrição Josué de Castro
Revisora

_____

Professora Drª. Aline Alves Ferreira
Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Nutrição Josué de Castro
Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo Daniel, meus familiares, minha mãe Andréia Silva, minha avó Maria do Carmo, minha irmã Karolly Silva, minha prima Cassiana Miranda e a Prof.ª Dr.ª Dayana Farias e Dr.ª Paula Normando pelo amor, apoio, incentivo,

paciência e compreensão. Sem eles eu não teria conseguido.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus que me iluminou e deu força nessa longa caminhada. E foi meu socorro presente na hora da angústia. Pois devido a pandemia do COVID-19, foram muitos desafios enfrentados.

Ao meu esposo Daniel Nunes, pelo incentivo de sempre buscar o que é melhor para mim, apoio aos estudos, paciência e compreensão pelas ausências. Obrigada por torna esse processo possível.

Aos meus familiares, minha mãe Andréia Silva, minha irmã Karolly Silva, minha avó Maria do Carmo e ao meu sobrinho Thalles Gabriel pelo incentivo que dão para eu sempre estudar, apoio e compreensão nos momentos de ausência.

A professora Haydê por me incentivar a me inscrever como apoio técnico para o Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019) e a profª. Inês Rugani por me indicar para a seleção.

A Profª. Drª. Nadya Alves Santos e Drª. Paula Normando, pela entrevista e seleção para atuar como apoio técnico do ENANI-2019. Essa oportunidade foi essencial para o desenvolvimento desta dissertação.

Ao professor Gilberto Kac pela iniciativa de desenvolver o ENANI-2019, por permitir que eu usasse os dados recém coletados na minha dissertação e por te aceito me orientar no mestrado.

A minha coorientadora Drª. Paula Normando, por ser uma amiga e companheira nessa caminha rumo ao título de mestre, por compartilhar comigo momentos de alegria e de tristeza, e por sempre me incentivar e não deixar eu desisti.

As minhas amigas Maiara Brusco, Juliana Vieira, companheira de mestrado, e Ana Lorena por me estimular a estudar, a buscar conhecimento cada vez mais, por ver em mim um potencial que nem eu via, por acreditar no meu trabalho, pelo carinho e incentivo.

A minha orientadora Profª. Drª. Dayana Farias por ser uma inspiração de mulher na ciência, por desenvolver um trabalho lindo na educação pública, por ter visto potencial em mim, por torna o mestrado mais leve e por me mostrar que o feito é melhor do que o perfeito. Por cada reunião, por me envolver em outras pesquisas e por acreditar em mim.

Todos foram essenciais nesse processo, principalmente porque esse trabalho foi desenvolvido num momento de incertezas e de muitas perdas devido a pandemia do

COVID-19. As trocas que fizemos nesta jornada, mesmo que distante, fortaleceram a minha opinião crítica, e me proporcionaram amadurecimento e crescimento, tanto pessoal como profissional. Sou muito grata a todos!

Rio de Janeiro, julho de 2022

Keronlainy Silva Salvatte Nunes

“**Porque melhor é a sabedoria do que os rubins; e de tudo o que se deseja nada se pode comparar com ela”**

(Provérbios 8:11)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Prevalência de deficiência de vitamina B12 em crianças de diferentes países. 29
Quadro 2. Prevalência de deficiência de vitamina B12 em crianças de diferentes regiões brasileiras..... 31
Quadro 3. Prevalência de deficiência de folato em crianças de diferentes países. 36
Quadro 4. Descrição da prevalência de deficiência de folato em crianças brasileiras.. 38

LISTA DE TABELAS

Table 1. Distribuition of the Brazilian children aged 6 to 59 months, according to selected variables. 73

Table 2. Prevalence of vitamin B12 deficiency and high folate serum concentrations in Brazilian children aged 6-59 months, according to selected variables - ENANI, 2019. 74

Supplemental Table 1. Vitamin B12 serum concentrations in Brazilian children aged 6-59 months, according to selected variables - ENANI, 2019. 76

Supplemental Table 2. Folate serum concentrations in Brazilian children aged 6-59 months, according to selected variables - ENANI, 2019. 77

Supplemental Table 3. Association between high folate serum concentrations (> 45.3nmol/L) and vitamin B12 deficiency (serum concentrations < 150 pmol/L) in Brazilian children aged 6-59 months - ENANI, 2019. 78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo intracelular de vitamina B12. 24
Figura 2. Metabolismo mitocondrial de vitamina B12. 25
Figura 3. Metabolismo de folato segundo a hipóteses de armadilha de metilfolato. 42
Figura 4. Efeito hipotético de altas concentrações de folato na deficiência de vitamina B12. 43
Figura 5. Fluxograma da população de estudo. 49
Figura 6. Fluxograma da coleta de dados gerais do ENANI-2019. 50
Figura 7. Fluxo das análises laboratoriais. 51
Figura 8. Diagrama acíclico não direcionado entre altas concentrações de folato e deficiência de vitamina B12. 53

LISTA DE SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ATP – Trifosfato de adenosina

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CV – Coeficiente de Variação

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ENANI – Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil

FI – Fator Intrínseco

HOLO-TC – Holotranscobalamina

IEN – Indicador Econômico Nacional

IC 95% – Intervalo de confiança de 95%

MMA – Ácido metilmalônico

MRP1 – Proteína 1 de resistência a múltiplas drogas

MTHF – Metilenotetrahidrofolateredutase

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – *Odds ratios*

PCFT – Transportador de folato acoplado a prótons

RFC – Transportador de folato reduzido

RNA – Ácido ribonucleico

SAM – S-adenosilmetionina

5-MTHF – 5-metiltetraidrofolato

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO **16**

RESUMO **17**

ABSTRACT **19**

1. INTRODUÇÃO **21**

2. REFERENCIAL TEÓRICO **23**

2.1 Vitamina B12 23

2.1.1 Funções metabólicas/ Papel funcional da vitamina B12 23
2.1.2 Biomarcadores de vitamina B12 25
2.1.3 Deficiência de vitamina B12 em crianças 27
2.2 Folato 32

2.2.1 Absorção e metabolismo do folato 32
2.2.2 Deficiência de folato e implicações para a saúde 33
2.2.3 Biomarcadores de folato 34
2.2.4 Prevalência da deficiência de folato 34
2.2.5 Altas concentrações de folato 39
2.2.6 Altas concentrações de folato *vs.* baixas concentrações de vitamina B12 40
2.2.7 Hipóteses sobre a relação entre altas concentrações de folato e baixas concentrações de vitamina B12 41

3. JUSTIFICATIVA **44**

4. HIPÓTESE **45**

5. OBJETIVOS **46**

5.1 Objetivo Geral 46

5.2 Objetivos Específicos 46

6. MATERIAL E MÉTODOS **47**

6.1 Desenho do estudo 47

6.2 População de estudo 47

6.3 Coleta de dados 49

6.4 Análises laboratoriais 50

6.4.1 Coleta sangue 50
6.4.2 Determinação das concentrações de folato e vitamina B12 51
6.5 Covariáveis 51

6.6 Análises estatísticas 52

6.7 Questões Éticas 53

7. RESULTADOS **55**

Artigo: High serum folate concentration and vitamin B12 deficiency in Brazilian children aged 6 to 59 months: data from the ENANI-2019 55

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS **79**

10. REFERÊNCIAS **80**

APRESENTAÇÃO

Durante a graduação em nutrição na Universidade do Estado do Rio de Janeiro, a academia sempre me despertou grande interesse. Durante o período em que fui monitora da disciplina de Alimentação e Nutrição em Saúde Coletiva, percebi a importância do desenvolvimento de pesquisas para elucidar lacunas e/ou trabalhar abordagens já tão consolidadas, com um novo olhar.

Após a formatura, surgiu a oportunidade de trabalhar como apoio técnico do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019), um estudo cujo objetivo era avaliar as práticas de aleitamento materno, consumo alimentar, estado nutricional antropométrico e deficiência de micronutrientes em crianças brasileiras menores de 5 anos.

Durante o trabalho como apoio técnico tive a oportunidade de acompanhar a coleta dos dados ainda em campo. Nesse período, surgiu o desejo de fazer o mestrado, apliquei a proposta para a coordenação executiva do ENANI-2019 e fui autorizada a trabalhar com os dados.

Dessa forma, esta dissertação utilizou dados de um inquérito nacional domiciliar, realizado em 123 municípios brasileiros, intitulado "Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019)". O ENANI-2019 foi o primeiro estudo com representatividade nacional que avaliou o estado nutricional de micronutrientes, como vitamina B12 e folato, em crianças brasileiras menores de 5 anos.

O ENANI-2019 foi coordenado pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, em conjunto com a Fundação Oswaldo Cruz, Universidade do Estado do Rio de Janeiro e Universidade Federal Fluminense, e contou com a colaboração de pesquisadores de dezenas de universidades e instituições públicas de todo o Brasil.

A presente dissertação tem como objetivo avaliar o estado nutricional de vitamina B12 e folato em crianças brasileiras entre 6 e 59 meses de acordo com variáveis socioeconômicas e demográficas. Além disso, será investigada a associação entre altas concentrações de folato e a deficiência da vitamina B12.

O presente documento está estruturado nas seguintes seções: introdução, referencial teórico, justificativa, hipóteses, objetivos, métodos, resultados, considerações finais, referências e anexos. Os resultados serão apresentados no formato de artigo científico. A formatação segue as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

RESUMO

SALVATTE, Keronlainy Silva. **Estado nutricional de vitamina B12 e folato em crianças brasileiras de 6 a 59 meses: Dados do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019).** Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) - Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Introdução: A vitamina B12 e o folato são nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento infantil adequado, mas pouco se sabe sobre o estado dessas vitaminas em crianças brasileiras menores de 5 anos e são escassas informações sobre a relação entre as concentrações sérica de folato e a deficiência de vitamina B12 nesta faixa etária. **Objetivo:** Descrever o estado nutricional de vitamina B12 e folato, estimar a direção e a magnitude da associação entre altas concentrações de folato e deficiência de vitamina B12 em crianças brasileiras entre 6 e 59 meses de idade. **Métodos:** Foram utilizados dados da Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019), inquérito populacional de base domiciliar realizado em 123 municípios brasileiros dos 26 Estados da Federação e no Distrito Federal, com crianças menores de 5 anos. A amostra do ENANI-2019 é representativa das macrorregiões brasileiras, de faixas etárias e sexo. Para o presente estudo foram analisados dados de 7.417 crianças de 6 a 59 meses que possuíam informações sobre vitamina B12 e concentrações séricas de folato. As crianças com concentrações séricas de vitamina B12 <150 pmol/L e folato <10 nmol/L foram classificadas com deficiência. Crianças com folato sérico >45,3nmol/L foram classificadas com altas concentrações de folato. A análise estatística incluiu modelos de regressão logística brutos e ajustados. Para definição do ajuste dos modelos foi construído diagrama acíclico não direcionado (DAG), que permitem a identificação do conjunto mínimo, mas suficiente de variáveis de ajuste (idade, escolaridade da mãe, consumo de alimentos fontes no dia anterior e consumo de alimentos ultraprocesados). Foram estimadas razões de chance (OR, do inglês *odds ratio*) e os intervalos de confiança de 95% (IC 95%). Todas as análises consideraram o desenho amostral complexo. **Resultados:** No Brasil 14,1% (IC95%: 12,2; 16,1) das crianças de 6 a 59 meses tinham deficiência de vitamina B12, 1,1% (IC95%: 0,5; 1,6) tinham deficiência de folato e 36,9% (IC95%: 33,4; 40,3) apresentaram altas concentrações de folato. Foi observada maior prevalência de deficiência de vitamina B12 em crianças da região Norte do Brasil quando comparadas a crianças das demais macrorregiões. A prevalência também foi maior em crianças de 6 e 23 meses (quando comparadas àquelas maiores de 24

meses), que tinham mães com menor escolaridade (0-7 anos de estudo *vs*. 8 anos ou mais) e classificadas no menor tercil do Indicador Econômico Nacional (IEN) (quando comparadas àquelas classificadas no 3º tercil). Crianças com altas concentrações séricas de folato tiveram chance 59% menor (OR: 0,41; IC 95%: 0,30; 0,57) de apresentar deficiência de vitamina B12 em comparação com crianças sem altas concentrações. **Conclusão:** Mais de uma em cada dez crianças brasileiras tem deficiência de vitamina B12 no Brasil, a deficiência de folato (1,1%) não é um problema de saúde pública no Brasil e mais de 30% das crianças tem altas concentrações de folato. Crianças com altas concentrações séricas de folato tiveram menor chance de apresentar deficiência de vitamina B12.

Palavras-chave: Deficiência de vitamina B12, Deficiência de folato, Altas concentrações de folato, Crianças.

ABSTRACT

SALVATTE, Keronlainy Silva. **Estado nutricional de vitamina B12 e folato em crianças brasileiras de 6 a 59 meses: Dados do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019)**. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) - Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Background: Vitamin B12 and folate are essential nutrients for adequate child growth and development, but little is known about the status of these vitamins in Brazilian children under 5 years of age and there is little information on the relationship between serum folate concentrations and Vitamin B12 deficiency in this age group. **Aim:** To describe the nutritional status of vitamin B12 and folate and estimate the direction and magnitude of the association between high serum folate concentrations and vitamin B12 deficiency in Brazilian children aged 6 to 59 months old. **Methods:** Data from the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019), a household-based population survey conducted in 123 Brazilian municipalities in the 26 states of the Federation and the Federal District, with children under five years of age. The ENANI-2019 sample is representative of Brazilian macro-regions, age groups, and sex. Data from 7,417 children aged 6 to 59 months who had information on vitamin B12 and serum folate concentrations were analyzed in the present study. Children with serum vitamin B12 concentrations <150 pmol/L and folate <10 nmol/L were classified as having deficiency. Children with serum folate >45.3nmol/L were classified as having high folate concentrations. Statistical analysis included crude and adjusted logistic regression models. A directed acyclic graph (DAG) was constructed to define the adjustment of the models. The DAG allows the identification of the minimum but sufficient set of adjustment variables (age, maternal formal education, consumption of foods sources of folate, and consumption of ultra-processed foods). Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) were estimated. All analyzes considered the complex sample design. **Results:** In Brazil, 14.1% (95%CI: 12.2; 16.1) of children aged 6 to 59 months had vitamin B12 deficiency, 1.1% (95%CI: 0.5; 1.6) had folate deficiency and 36.9% (95%CI: 33.4; 40.3) had high folate concentrations. A higher prevalence of vitamin B12 deficiency was observed in children from the North region of Brazil compared with children from other macro-regions. The prevalence was also higher in children aged 6 and 23 months (compared with those older than 24 months), who had mothers with lower years of formal education (0-7 years of schooling vs. 8 years or more) and classified in the lowest tertile

of the National Wealth Index (IEN) (compared with those classified in the 3rd tertile). Children with high serum folate concentrations had 59% lower odds (OR: 0.41; 95% CI: 0.30; 0.57) of having vitamin B12 deficiency, compared with children without high concentrations. **Conclusion:** More than one out of ten Brazilian children had vitamin B12 deficiency in Brazil, folate deficiency (1.1%) is not a public health problem, and more than 30% of children had high folate concentrations. Children with high serum folate concentrations were less likely to have vitamin B12 deficiency.

Keywords: Vitamin B12 deficiency, Folate deficiency, High folate concentrations, Children.

1. INTRODUÇÃO

Os micronutrientes são essenciais para o adequado funcionamento do organismo humano nas diferentes fases da vida (BAILEY; WEST; BLACK, 2015; DARNTON-HILL, 2019). No entanto, a deficiência de micronutrientes ainda é um problema de saúde pública recorrente que acomete principalmente mulheres e crianças nos países em desenvolvimento (BRITO et al, 2015). Estima-se que 340 milhões de crianças menores de 5 anos, no mundo, sofrem de carências nutricionais, e tendem a consumir alimentos de alta densidade energética e pobre em micronutrientes, o que compromete o crescimento físico e desenvolvimento cognitivo adequado, prejudicando a produtividade futura dessas crianças e a formação de capital humano (UNICEF, 2019).

Apesar de alguns estudos observarem diminuição na prevalência do déficit de altura em crianças brasileiras (GARCIA; RONCALLI, 2020; GONCALVES et al, 2019), a falta de acesso aos alimentos ainda é um problema que contribui para piores condições de nutrição e saúde na infância (PEREIRA et al, 2017). Estima-se que 47,1% dos domicílios com crianças brasileiras menores de 5 anos apresentam algum grau de insegurança alimentar (UFRJ, 2021). Além disso, carências nutricionais raramente são diagnosticadas precocemente, o que pode levar ao agravamento do quadro clínico até a identificação (UNICEF, 2019).

No Brasil, a última pesquisa que avaliou biomarcadores sanguíneos do estado nutricional de crianças menores de 5 anos foi a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS) realizada em 2006. No entanto, a PNDS estimou apenas a prevalência de anemia e deficiência de vitamina A (BRASIL, 2009)

A vitamina B12 é essencial para o funcionamento neurológico adequado, estando envolvida em processos como o desenvolvimento cerebral, mielinização neural e função cognitiva (SCOTT; MOLLOY, 2012; VENKATRAMANAN et al, 2016). A deficiência de vitamina B12 em crianças, apesar de ser usualmente subestimada, tem sido considerada um problema de saúde pública global (ALLEN et al, 2018; DARNTON-HILL, 2019). Existem evidências de que a deficiência de vitamina B12 em crianças pode causar déficits no crescimento e no desenvolvimento cognitivo (BAHADIR; REIS; ERDURAN, 2014; COBAYASHI et al, 2015). As populações com menor poder aquisitivo, são as que estão potencialmente em maior risco para a deficiência desse micronutriente (ALLEN et al, 2018).

O folato possui funções semelhantes às da vitamina B12, entre as quais destacam-se a importância para o crescimento e desenvolvimento infantil, estando envolvido na síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas (ALLEN et al, 2018;

BRITO et al, 2015; PFEIFFER et al, 2015). Existem evidências de que a deficiência de folato durante a gestação está associada a malformações congênitas de fechamento do tubo neural, prematuridade e baixo peso ao nascer (ALLEN et al, 2018; BRAUN et al, 2015; WHO, 2015; PFEIFFER et al, 2015; SOLOMON, 2013).

Como medida para diminuir o risco de malformações congênitas de fechamento do tubo neural, o folato (na forma de ácido fólico) é adicionado a farinhas de trigo e milho em 80 países, incluindo o Brasil (BRASIL, 2002; BRITO et al, 2015; PFEIFFER et al, 2015). Após a política de fortificação das farinhas de trigo e milho, a deficiência de folato parece não ser um problema de saúde pública em países da América Latina, onde são observadas baixas prevalências de deficiência (<5%) desse micronutriente (BRITO et al, 2015). Por outro lado, um estudo desenvolvido em quatro cidades brasileiras (Goiânia, Olinda, Rio Branco e Porto Alegre), observou que 30,9% das crianças entre 11 e 15 meses tinham altas concentrações séricas de folato, superiores a 50 nmol/L (SILVA et al, 2019).

De acordo com os valores de referência preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), concentrações séricas de folato superiores a 45,3 nmol/L são consideradas elevadas (WHO, 2015), e estudos têm associado essa condição ao agravamento da deficiência de vitamina B12, aumento do risco de desenvolvimento da anemia, comprometimento cognitivo, obesidade e diabetes (ALLEN et al, 2018; BRITO et al, 2015; LAI et al, 2019; MORRIS et al, 2007; YAJNIK et al, 2008). Apesar dos mecanismos que explicam essa associação não estarem completamente estabelecidos, já foi observado que a diminuição nas concentrações séricas de vitamina B12 podem ser agravadas por altas concentrações séricas de folato (BAILEY et al, 2020; SELHUB; MORRIS; JACQUES, 2007; SELHUB; ROSENBERG, 2016; SOLOMON, 2013).

Dessa forma, a vitamina B12 e o folato são micronutrientes importantes para o crescimento e desenvolvimento infantil adequados. Contudo, não existe na literatura estudos que tenham avaliado o estado nutricional desses nutrientes em nível nacional em crianças menores de 5 anos. Além disso, são escassas informações sobre a relação entre altas concentrações de folato e a deficiência de vitamina B12 nesta faixa etária.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vitamina B12

A vitamina B12 (também conhecida como cobalamina), não é um micronutriente sintetizado pelo organismo humano, sendo encontrado em alimentos de origem animal, tais como carnes, ovos, leite e outros produtos lácteos. Estima-se que cerca de 30 a 38,5% do consumo total de vitamina B12 seja oriundo de carnes e laticínios (OBEID et al, 2019).

A partir da digestão de proteínas de origem animal, ocorre a liberação da vitamina B12 no estômago por ação do ácido clorídrico e da enzima gástrica (pepsina). Uma vez liberada, a vitamina se liga ao seu transportador denominado transcobalamina I (também conhecido como haptocorrina), formando o complexo R-B12. No intestino delgado, esse complexo é degradado pelas proteases pancreáticas, seguido da ligação da vitamina B12 ao fator intrínseco (FI), produzido pelas células parietais gástricas. No íleo terminal, esse complexo (B12+FI) é aderido às células epiteliais, levando à absorção da vitamina B12 (ALLEN et al, 2018; OBEID et al, 2019; PANIZ et al, 2005).

Na corrente sanguínea, a vitamina B12 circula ligada a duas proteínas de transporte: transcobalamina e haptocorrina. Cerca de 80% da vitamina B12 presente no plasma se liga à proteína de transporte haptocorrina, que é absorvida pelo fígado, onde a vitamina B12 é armazenada. Os outros 20% se ligam à proteína de transporte transcobalamina, formando um complexo, holo-TC (holotranscobalamina), que adentra a circulação portal e é distribuída para as células que expressam receptores específicos, os quais internalizam a vitamina B12 (ALLEN et al, 2018; OBEID et al, 2019; PANIZ et al, 2005).

A circulação entero-hepática é outro mecanismo importante na absorção de vitamina B12, pois a vitamina B12 excretada pela bile é reabsorvida pelo enterócito ileal. Esse mecanismo é importante para a conservação desta vitamina no organismo, podendo levar anos para que haja depleção ou deficiência deste micronutriente (ALLEN et al, 2018).

2.1.1 Funções metabólicas/ Papel funcional da vitamina B12

A vitamina B12 é essencial para o funcionamento adequado do sistema nervoso, pois está envolvida em processos como a mielinização neural. Além disso, esse micronutriente é importante para o desenvolvimento cerebral e hematopoiese, pois está envolvida na síntese de DNA. A vitamina B12 exerce essas funções uma vez que, atua como cofator de duas enzimas, a (1) metionina sintase envolvida na síntese de ácidos nucleicos e que promove a metilação da

homocisteína à metionina; e (2) L-metilmalonil-coA mutase que realiza a conversão de metilmalonil coenzima A em succinil coenzima A, na metabolização dos ácidos graxos (ALLEN et al, 2018; PANIZ et al, 2005).

No processo de metilação da homocisteína, a vitamina B12 atua como cofator, promovendo a metilação por meio da metionina sintase, tendo o 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) como doador de grupamento metil e a metilcobalamina como co-fator. Após a metilação da homocisteína, a metionina formada é condensada com o trifosfato de adenosina (ATP), resultando na S-adenosilmetionina (SAM). Assim, a metilação da homocisteína serve para repor os estoques de SAM quando a metionina dietética apresenta baixas concentrações sanguíneas, pois este é o único doador de grupamentos metil para numerosas reações de metilação, incluindo algumas essenciais para a manutenção da mielina, mantendo o funcionamento adequado dos sistemas nervosos periférico e central (ALLEN et al, 2018; GROBER; KISTERS; SCHMIDT, 2013; PANIZ et al, 2005) (**Figura 1**).

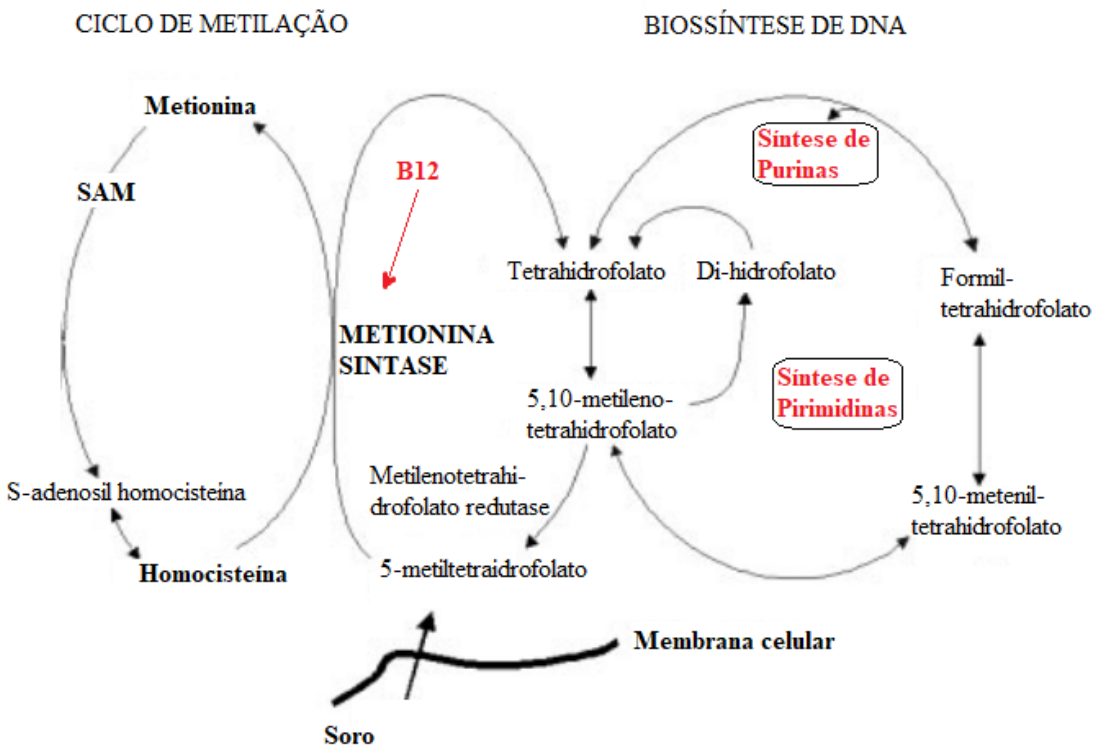


Figura 1. Metabolismo intracelular de vitamina B12.
Fonte: Traduzido e adaptado de SMULDERS et al, 2006

Como a vitamina B12 atua como cofator da metionina sintase, envolvida na síntese de purinas e timidinas dos ácidos nucléicos (**Figura 1**), o baixo aporte desse micronutriente pode

prejudicar a síntese do DNA. A síntese inadequada de DNA tem como consequência falhas na divisão e maturação celular, o que leva a síntese de hemácias com tamanho aumentado e com outras alterações morfológicas, como formas irregulares, membranas celulares frágeis e núcleos grandes, que caracterizam a anemia megaloblástica, manifestação que prejudica o desenvolvimento infantil (ALLEN et al, 2018; OBEID et al, 2019; PANIZ et al, 2005).

Já na conversão de metilmalonil-CoA para succinil-CoA, a vitamina B12 atua como cofator da metilmalonil-CoA mutase, enzima responsável por esse processo. Essa etapa é intermediária a conversão de propionato em succinato, sendo essa conversão importante na oxidação dos ácidos graxos de cadeia ímpar e no catabolismo dos aminoácidos cetogênicos. Vale ressaltar que na ausência de vitamina B12, o metilmalonil-CoA é hidrolisado em ácido metilmalônico (MMA), gerando um acúmulo deste ácido no organismo (ALLEN et al, 2018; OBEID et al, 2019; PANIZ et al, 2005) (**Figura 2**).

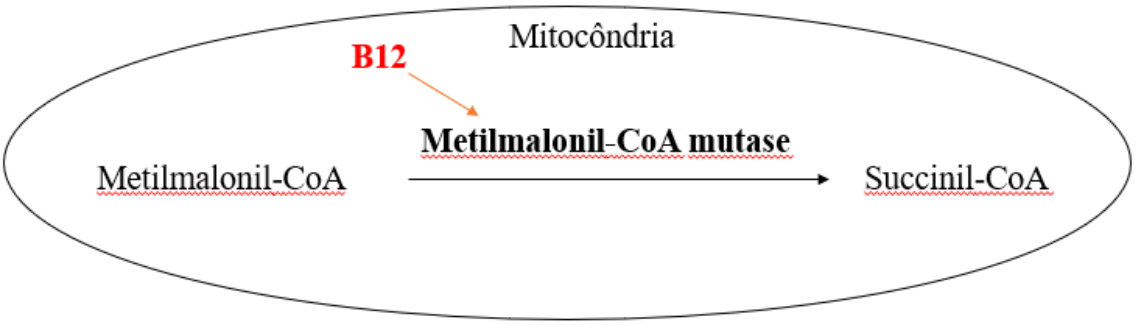


Figura 2. Metabolismo mitocondrial de vitamina B12.

2.1.2 Biomarcadores de vitamina B12

Entender os processos de absorção e as funções metabólicas da vitamina B12 é importante para compreender como é avaliado o estado desta vitamina no organismo humano. Atualmente os biomarcadores utilizados para mensurar o estado de vitamina B12 são (1) concentrações de vitamina B12 no soro/plasma; (2) concentrações de holoTC no soro; (3) concentrações de MMA no soro; e (4) concentrações de homocisteína no plasma (ALLEN et al, 2018; PANIZ et al, 2005).

A avaliação das concentrações séricas/plasmáticas de vitamina B12 fornece informação precisa sobre o estado desta vitamina a longo prazo, sendo utilizado para avaliar grupos populacionais e respostas às intervenções. Além disso, os ensaios são amplamente disponíveis e de menor custo e não são afetados pela ingestão recente dos alimentos fontes. No entanto, a

vitamina B12 é sensível à luz e ao manuseio, complexificando a coleta de sangue em estudos de campo (ALLEN et al, 2018; DE BENOIST, 2008).

Uma outra maneira de avaliar o estado de vitamina B12 é mensurando o complexo da vitamina mais o seu transportador, também conhecido como holoTC. As concentrações de holoTC no soro fornecem informações sobre a vitamina B12 disponível para as células, sendo sensível à ingestão recente. Assim, este não é um bom indicador funcional do estado de vitamina B12. Uma limitação do uso deste biomarcador é que não há consenso sobre os pontos de corte a serem adotados (ALLEN et al, 2018; DE BENOIST, 2008).

Outro biomarcador utilizado, é a concentração de MMA no soro. Este metabólito é produzido, principalmente, na ausência da vitamina B12. Assim, baixas concentrações de MMA refletem a adequação desta vitamina para a função metabólica e as reservas no fígado. Além disso, este biomarcador não é afetado pelo status de folato, riboflavina ou vitamina B6. No entanto, os ensaios são de alto custo, podem ser afetados por disfunções renais e tendem a ser elevados em populações de baixa renda (independente do estado de vitamina B12), sendo assim este biomarcador apresenta baixa especificidade (ALLEN et al, 2018).

A avaliação das concentrações de homocisteína no plasma reflete a adequação de vitamina B12 para a função metabólica. Contudo, as concentrações de homocisteína também são afetadas pelo status de folato, riboflavina e/ou vitamina B6, por disfunções renais e pelo hipotireoidismo, não sendo específico para o estado de vitamina B12 (ALLEN et al, 2018; DE BENOIST, 2008).

A concentração plasmática de vitamina B12 é o biomarcador que melhor fornece informações sobre o estado desta vitamina. Por outro lado, a deficiência de vitamina B12 está relacionada com o aumento das concentrações dos seus outros metabólitos plasmáticos (homocisteína e MMA). Nesse sentido, um estudo realizado pelo *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III) nos Estados Unidos, estimou as concentrações plasmáticas de vitamina B12, onde a homocisteína e o MMA ainda não se tornaram elevados. Com base neste estudo, foram estabelecidos os pontos de corte utilizados para avaliar o estado nutricional da vitamina B12 nas populações. Assim, concentrações séricas/plasmáticas de vitamina B12 menores que 150 pmol/L (203 pg/mL) definem a deficiência desse micronutriente, e elevam as concentrações de homocisteína e MMA. Ainda é desafiador a interpretação das concentrações dos outros biomarcadores relacionados ao estado de vitamina B12, sendo necessários mais estudos para estabelecer pontos de corte válidos, para uma correta utilização das informações (ALLEN et al, 2018; DE BENOIST, 2008).

2.1.3 Deficiência de vitamina B12 em crianças

Em países em desenvolvimento, a deficiência de vitamina B12 é mais prevalente em populações mais pobres, sendo a principal causa de deficiência a ingestão alimentar inadequada. O consumo restrito de alimentos de origem animal pode acontecer devido a razões culturais ou religiosas, econômicas e, devido às dificuldades de acesso a esses alimentos (ALLEN, 2009; RAMIREZ-VELEZ et al, 2016). Em crianças menores de 2 anos, baixas concentrações séricas de vitamina B12 estão fortemente relacionadas ao estado de vitamina B12 materno durante a gestação e no período de lactação (ALLEN et al, 2018).

Um estudo transversal realizado com 500 pares de mães e filhos (2 a 11 meses), no Nepal, observou que a ingestão e as concentrações plasmáticas de vitamina B12 maternas, e as concentrações plasmáticas de vitamina B12 de crianças menores de 1 ano predizem o crescimento linear aos 5 anos de idade. Para cada 1µg/dia de vitamina B12 ingerido pela mãe durante a lactação há aumento de 0,4 (0,2; 0,6) escores z de altura para idade e 1,7 (0,7; 2,7) centímetros na estatura dos filhos aos cinco anos de idade (STRAND et al, 2018).

Crianças com deficiência de vitamina B12 têm maior risco de agravos em saúde, que incluem sintomas hematológicos, como a anemia megaloblástica, e neurológicos, como atrasos de desenvolvimento. Além disso, a anemia megaloblástica pode afetar o desenvolvimento físico e cognitivo, aumentando o risco de morbidade (RAMIREZ-VELEZ et al, 2016).

Umasanker et al (2020) observaram que 64,8% de crianças e adolescentes indianos entre 1 e 18 anos tinham concentrações de vitamina B12 <300 pmol/L. Os autores observaram que o grupo com vitamina B12 <300 pmol/L tinham maior proporção de perda de peso (44,1% vs. 18,0%, p=0,216) e de atraso no desenvolvimento (6,3% vs. 0,0%, p=0,05), quando comparadas as crianças com concentrações de vitamina B12 ≥300 pmol/L. Além disso, as manifestações neurológicas foram mais predominantes nas crianças menores de 6 anos e as alterações hematológicas mais frequentes nas crianças com mais de 6 anos (UMASANKER et al, 2020).

Um estudo realizado com 1.298 crianças chinesas entre 6 e 18 meses que avaliou o estado de vitamina B12 e o nível cognitivo dessas crianças, observou que concentrações plasmáticas de vitamina B12 foram positivamente correlacionadas com o escore cognitivo (beta = 2,15, S = 0,55, P <0,001) e o escore motor fino (beta = 0,71, SE = 0,31, P = 0,023) (SHENG et al, 2019).

A deficiência de vitamina B12 é reconhecida como um importante problema de saúde pública e conhecer a magnitude desse problema é uma das formas de melhorar o estado de

saúde da população. No entanto, atualmente não é conhecida a prevalência da deficiência mundial desta vitamina (ALLEN et al, 2018). Um estudo de revisão que analisou dados disponíveis sobre as concentrações plasmáticas de vitamina B12 nas Américas, verificou que, pelo menos, 40% dos indivíduos tinham concentrações plasmáticas de vitamina B12 deficientes (<150 pmol/L) ou marginais (150–221 pmol/L) em países como México, Guatemala, Costa Rica, Cuba e Chile (ALLEN, 2004).

Para essa dissertação, foi feita uma busca bibliográfica no período de março de 2020 a março de 2021, para mapear a prevalência da deficiência da vitamina B12 em crianças de diferentes países. Conforme apresentado no **Quadro 1**, a prevalência da deficiência da vitamina B12 variou de 1,6% a 49%. Os estudos apresentam diferenças metodológicas importantes como, a faixa etária de avaliação das crianças (6 meses a 18 anos) e os pontos de corte para classificação da deficiência (<148 pmol/L a <150 pmol/L).

Um ensaio clínico randomizado realizado com 1.298 crianças chinesas de 6 a 18 meses para explorar o estado da vitamina B12, observou que 16,7% (n=62) das crianças antes da intervenção eram deficientes em vitamina B12 (<148 pmol/L; <200 pg/mL) (SHENG et al, 2019). Strand et al (2018) observaram que 15% (n=500) de crianças nepalesas de 2 a 11 meses tinham deficiência de vitamina B12 (<148 pmol/L) (STRAND, TOR A et al., 2018). Em um outro estudo, Strand et al (2013) observaram que 27% (n=650) de crianças de 12 a 18 meses na Índia, eram deficientes em vitamina B12 (<150 pmol/L) (STRAND et al., 2013). Cuevas-Nasu et al (2012) observaram que 7,7% (n=2.099) de crianças mexicanas de 1 a 6 anos tinham deficiência de vitamina B12 (<148 pmol/L) e que esta prevalência era maior entre as crianças com 1 anos (9,1%) (CUEVAS-NASU et al, 2012).

Um estudo realizado na Colômbia, observou que 1,6% (n=2.800) das crianças de 5 a 12 anos eram deficientes em vitamina B12 (<148 pmol/L) (VILLAMOR et al, 2008). Jones et al (2007) observaram que 49% (n= 304) de crianças na Guatemala com idade de 1 ano tinham deficiência de vitamina B12 (<148 pmol/L) (JONES et al, 2007).

Um ensaio clínico randomizado com 2.482 crianças de 6 a 30 meses que residiam no norte da Índia, observou que 36% das crianças amamentadas e 9% das não amamentadas, tinham baixas concentrações de cobalamina plasmática (<150 pmol/L) (TANEJA et al., 2007). McLean et al (2007) ao realizarem um ensaio clínico randomizado observou que 32,5% (n=120) das crianças de 5 a 14 anos do grupo controle eram deficientes em vitamina B12 (MCLEAN et al, 2007).

Quadro 1. Prevalência de deficiência de vitamina B12 em crianças de diferentes países.

Autor	Ano	Origem (País)	Tipo de estudo	Tamanho amostral	Material Biológico	Método de análise laboratorial	Ponto de corte para deficiência	Idade	Prevalência
Sheng et al,	2019	China	Ensaio Clínico Randomizado	1.298	Plasma	Imunoensaio quimioluminescente	<148 pmol/L	6 a 18 meses	16,7%
Strand et al,	2018	Nepal	Transversal	500	Plasma	Ensaio Microbiológico	<148 pmol/L	2 a 11 meses	15%
Strand et al,	2013	Nova Delhi (Índia)	Transversal	650	Plasma	Ensaio Microbiológico	<150 pmol/L	12 a 18 meses	27%
Cuevas-Nasu et al,	2012	México	Transversal	2.099	Plasma	Imunoensaio enzimático competitivo	<148 pmol/L	1 a 6 anos	7,7% (Todos); 9,1% (1 ano)
Villamor et al,	2008	Colômbia	Transversal	2.800	Plasma	Imunoensaio quimioluminescente competitivo	<148 pmol/L	5 a 12 anos	1,60%
Jones et al,	2007	Guatemala	Transversal	304	Plasma	Radioensaio	<148 pmol/L	1 ano	49%
Taneja et al,	2007	Nova Delhi (Índia)	Ensaio Clínico Randomizado	2.482	Plasma	Ensaios Microbiológicos	<150 pmol/L	6 a 30 meses	36% (amamentadas); 9% (não amamentadas)
McLean et al,	2007	Quênia	Ensaio Clínico Randomizado	503	Plasma	Radioensaio	<148 pmol/L	5 a 14 anos	33%

No Brasil há poucos estudos que avaliaram as prevalências da deficiência de vitamina B12 (**Quadro 2**). Silva et al (2019) ao avaliarem o estado de vitamina B12 em crianças de 11 a 15 meses de 4 cidades diferentes (Goiânia, Olinda, Rio Branco e Porto Alegre), observaram que 15% (n=460) delas tinham deficiência de vitamina B12 (<148 pmol/L) (SILVA et al, 2019).

Um estudo que avaliou 988 crianças da região amazônica, verificou que 13,6% das crianças menores de 2 anos e 4,2% das crianças até 10 anos tinham deficiência de vitamina B12 (<150 pmol/L) (COBAYASHI et al, 2015). Lander et al (2013) ao examinarem o estado de micronutrientes em 357 pré-escolares que frequentavam creches em Salvador, identificaram que 0,3% das crianças tinham deficiência de vitamina B12 (<148 pmol/L), vale ressaltar que as crianças ficavam em tempo integral nas creches gratuitas que forneciam cinco refeições diárias e que havia nutricionista no local (LANDER et al, 2014).

Cardoso et al (2012) observaram que 3,7% (n=1.111) de crianças entre 6 meses e 10 anos tinham deficiência de vitamina B12 (<150 pmol/L), sendo está prevalência maior (12%) em crianças de 6 meses a 2 anos (CARDOSO et al, 2012). Garcia et al (2011) observaram que 11,7% (n=164) de crianças de 6 meses a 10 anos que residiam em Acrelândia eram deficientes em vitamina B12 (<148 pmol/L) (GARCIA; GRANADO; CARDOSO, 2011).

A maior parte dos estudos apresentados são transversais, e avaliaram crianças de países em desenvolvimento. Como podemos notar, houve uma ampla variação da prevalência da deficiência de vitamina B12 nos estudos internacionais e nacionais e isso pode ser decorrente da (1) diversidade cultural e socioeconômica dos países, e da (2) diferença no método usado para estimar as concentrações plasmáticas de vitamina B12. Além disso, os estudos utilizaram pontos de corte diferentes para estimar deficiência e as crianças são de uma ampla faixa etária. Um aspecto positivo é que todos os estudos utilizaram as concentrações plasmáticas para avaliar as concentrações de vitamina B12, permitindo assim a comparação entre eles.

Quadro 2. Prevalência de deficiência de vitamina B12 em crianças de diferentes regiões brasileiras.

Autor	Ano	Município (UF)	Desenho do estudo	Tamanho amostral	Material Biológico	Método de análise laboratorial	Ponto de corte para deficiência	Idade	Prevalência
Silva et al,	2019	Goiânia (GO); Olinda (PE); Rio Branco (AC); Porto Alegre (RS)	Transversal	460	Plasma	Fluoroimunoensaio	<148 pmol/L	11 a 15 meses	15%
Cobayashi et al,	2015	Acrelândia (AC)	Transversal	988	Soro	Fluoroimunoensaio	<150 pmol/L	Até 10 anos	13,6% (< 2 anos); 4,2% (Todos)
Lander et al,	2013	Salvador (BA)	Transversal	357	Plasma	Imunoensaio de eletroquimioluminescência	<148 pmol/L	3 a 6 anos	0%
Cardoso et al,	2012	Acrelândia (AC)	Transversal	1.111	Plasma	Fluoroimunoensaio	<150 pmol/L	0,5 a 10 anos	3,70%
Garcia et al,	2011	Acrelândia (AC)	Transversal	164	Plasma	Fluoroimunoensaio	<148 pmol/L	0,5 a 10 anos	11,70%

2.2 Folato

O folato é uma vitamina do complexo B (também chamado de vitamina B9), que atua na biossíntese de precursores da síntese de DNA e RNA (purina e timidilato) e no metabolismo de aminoácidos, sendo essencial para o crescimento e desenvolvimento. Essa vitamina não é sintetizada pelo organismo humano, sendo sua principal fonte os vegetais com folhas verde escuro, frutas e leguminosas (PFEIFFER et al, 2015).

O ácido fólico (ácido pteroilmonoglutâmico) é a forma sintética do folato e não é encontrado naturalmente nos alimentos. Contudo, como o ácido fólico é a forma mais estável da vitamina B9, é utilizado em suplementos dietéticos e em alimentos fortificados (CHAN; BAILEY; O'CONNOR, 2013; PFEIFFER et al, 2015).

2.2.1 Absorção e metabolismo do folato

O folato está presente nos alimentos na forma de poliglutamatos de tetrahidrofolato e devido a sua natureza hidrofílica, são necessários transportadores específicos para que ocorra a absorção e o transporte deste micronutriente (PFEIFFER et al, 2015; ZHAO; MATHERLY; GOLDMAN, 2009).

No jejuno proximal os folatos são hidrolisados em monoglutamatos de tetrahidrofolato por meio da enzima glutamato carboxipeptidase II. Após a hidrólise, os folatos em partículas menores, são absorvidos pelo transportador de folato acoplado a prótons (PCFT). Após a absorção intestinal, os folatos entram no sistema porta hepático, sendo transportados para o fígado, onde os monoglutamatos de tetrahidrofolato podem: (1) ser convertidos em formas de armazenamento de poliglutamato; ou (2) ser secretados na bile, retornar ao duodeno e jejuno e ser reabsorvidos; ou (3) atingir os tecidos por meio da circulação sistêmica (ZHAO et al, 2009).

Vale ressaltar que o PCFT é o responsável pela atividade de transporte de folato a muitos tecidos. Os transportadores de folato reduzidos (RFC) são responsáveis pela distribuição de folato aos tecidos sistêmicos, e dois receptores de folato (FRα e FRβ) presentes na membrana celular, transportam por meio de endocitose este micronutriente até as células. No meio intracelular, o folato é processado em cofatores metabólicos por meio do restabelecimento do peptídeo poliglutamato, que retém a vitamina dentro das células e aumenta sua afinidade por enzimas dependentes de folato (PFEIFFER et al, 2015; ZHAO et al, 2009).

O ácido fólico, encontrado em alimentos fortificados e suplementos vitamínicos, é oxidado e facilmente transportado pelos PCFT, presente no epitélio intestinal. Essa forma é reduzida para di-hidrofolato e depois a tetrahidrofolato pela enzima diidrofolato redutase, e

convertida a poliglutamato para funcionar como um cofator metabólico (BAILEY et al, 2015; ZHAO et al, 2009). Os cofatores metabólicos são ativados quimicamente, e aceitam ou doam carbonos únicos para uma rede de vias metabólicas interconectadas, chamadas de metabolismo de um carbono (ZHAO et al., 2009).

O metabolismo de um carbono é uma sequência de reações dependentes de folato, que são importantes para o metabolismo de aminoácidos, síntese de purinas e pirimidinas e a formação do agente de metilação primário (SAM). Assim, a principal função das coenzimas de folato é doar ou aceitar unidades de um carbono (BAILEY; GREGORY, 1999) (**Figura 1**).

Portanto, o folato é necessário para a remetilação da homocisteína em metionina (com o 5-MTHF como doador de grupamento metil), síntese de DNA, reações de metilação que afetam processos críticos, como metilação de citosina no DNA para controle da expressão gênica e síntese de neurotransmissores e proliferação celular (PFEIFFER et al, 2015).

2.2.2 Deficiência de folato e implicações para a saúde

A ingestão inadequada e/ou a necessidade elevada da vitamina ainda é uma das principais causas da deficiência de folato, que pode se desenvolver em pessoas de qualquer idade. No entanto, os indivíduos de nível socioeconômico mais baixo são os mais acometidos, devido à baixa ingestão de alimentos fontes (PFEIFFER et al, 2015).

Quando há deficiência de folato, todas as reações no metabolismo de um carbono serão comprometidas e vários substratos e intermediários metabólicos se acumulam acarretando consequências negativas. A homocisteína plasmática, é um exemplo. Na deficiência de folato, esse substrato fica elevado, aumentando o risco de vários tipos de doenças vasculares (BAILEY; GREGORY, 1999).

A deficiência severa de folato também produz a anemia megaloblástica. Isso ocorre porque há um comprometimento geral da divisão celular, relacionado ao papel do folato na síntese de ácido nucléico, comprometendo o sistema hematopoiético, acumulando megaloblastos (células precursoras de eritrócitos), e diminuindo o número de leucócitos e plaquetas (BAILEY; GREGORY, 1999).

O estado inadequado de folato durante a gestação tem sido associado a resultados adversos, que incluem malformações congênitas de fechamento do tubo neural, distúrbios da crista neural (por exemplo, defeitos cardíacos congênitos), retardo do crescimento fetal, baixo peso ao nascer, parto prematuro e deficiência neonatal de folato (PFEIFFER et al, 2015).

2.2.3 Biomarcadores de folato

Entender os processos de absorção e as funções metabólicas do folato é importante para compreender como é avaliado o estado desta vitamina no organismo humano. Atualmente, o estado de folato pode ser mensurado por meio de biomarcadores, como (1) folato sérico, (2) folato eritrocitário e a (3) homocisteína plasmática (PFEIFFER et al, 2015).

O folato sérico é um biomarcador que fornece informações do estado de folato de curto prazo, refletindo a ingestão alimentar recente. Este biomarcador é utilizado para avaliar grupos populacionais e respostas às intervenções devido ao menor custo dos ensaios. No entanto, o folato é pouco estável, e sua sensibilidade exige um manuseio cuidadoso do sangue coletado. Além disso, a presença de hemólise prejudica a análise, visto que o folato eritrocitário é liberado no soro, aumentando concentrações de folato sérico (PFEIFFER et al, 2015).

O folato eritrocitário é um biomarcador sensível do estado de folato, refletido o estado desta vitamina de longo prazo, e representando aproximadamente 50% do folato corporal total. Uma limitação do uso deste biomarcador é que não há consenso sobre os pontos de corte a serem adotados até o momento. Além disso, a comparabilidade entre os métodos usados para dosar o folato eritrocitário é inferior do que a dos métodos adotados para avaliar o folato sérico (PFEIFFER et al, 2015).

A homocisteína plasmática é um biomarcador funcional do estado de folato. Contudo, as concentrações de homocisteína plasmática são afetadas pelo estado de vitamina B12, riboflavina e/ou vitamina B6, por disfunções renais e pelo hipotireoidismo, não sendo específico para avaliar somente o estado de folato (PFEIFFER et al, 2015).

2.2.4 Prevalência da deficiência de folato

A deficiência do folato tem sido relacionada a um conjunto específico de distúrbios graves no desenvolvimento, associados a malformações congênitas de fechamento do tubo neural durante o desenvolvimento embrionário (PFEIFFER et al, 2015). Estudos evidenciaram que a suplementação de ácido fólico durante o período periconcepcional foi associada a redução de 62% do risco de malformações congênitas de fechamento do tubo neural (BLENCOWE et al, 2010). No entanto, os mecanismos metabólicos pelos quais o folato promove o fechamento do tubo neural e reduz o risco de malformações congênitas de fechamento do tubo neural, ainda não são completamente conhecidos (EBARA, 2017; PFEIFFER et al, 2015).

Apesar da escassez de evidências sobre o mecanismo que expliquem a relação entre o folato e a etiologia das malformações congênitas de fechamento do tubo neural, para reduzir o

número de casos, os Estados Unidos (EUA) implementaram a fortificação obrigatória de farinhas e cereais matinais com ácido fólico em 1998. Atualmente a política de fortificação com ácido fólico foi implementada em 80 países ao redor do mundo, incluindo o Brasil (EBARA, 2017; FIELD; STOVER, 2018; PFEIFFER et al, 2015).

A fortificação da farinha com ácido fólico é considerada uma das intervenções de saúde pública mais eficazes e econômicas. Vários estudos observaram redução nas malformações congênitas de fechamento do tubo neural, variando de 19% a 32%, após o início da fortificação nos EUA e em vários outros países (CENTENO TABLANTE et al, 2019). Assim, a deficiência de folato parece não ser um problema de saúde pública (prevalência <5%) na América Latina (BRITO et al, 2015).

No período de março de 2020 a março de 2021, foi feita busca bibliográfica para mapear a prevalência da deficiência de folato em crianças de diferentes países. Os resultados foram sintetizados no **Quadro 3**. A prevalência da deficiência de folato variou de 0% a 15%, e os estudos apresentaram ampla faixa etária (6 meses a 14 anos) e diferentes pontos de corte para a deficiência.

Strand et al (2018) em estudo realizado com crianças entre 2 e 11 meses no Nepal, verificaram que nenhuma criança tinha deficiência de folato (<10 nmol/L) (STRAND et al, 2018). Em um estudo transversal com crianças indianas de 12 a 18 meses, foi observado que 15,5% (n=650) das crianças tinham deficiência de folato (<5 nmol/L) (STRAND et al, 2013). Cuevas-Nasu et al (2012) ao descrever a magnitude e distribuição da deficiência de folato em crianças mexicanas, observaram que 3,2% das crianças de 1 a 6 anos tinham deficiência de folato (<10 nmol/L) e que esta prevalência aumentava entre as crianças com 2 anos (7,9%) (CUEVAS-NASU et al, 2012).

Jones et al (2007) não observaram deficiência de folato (<6,8 nmol/L) em crianças na Guatemala com 1 ano de idade (JONES et al, 2007). Taneja et al (2007) ao estimar a prevalência de deficiência de folato entre crianças de 6 a 30 meses na Índia, observaram que 15% das crianças tinham deficiência de folato (<5 nmol/L) (TANEJA et al, 2007). Já Siekmann et al (2003) não identificaram deficiência de folato em crianças com idade entre 5 e 14 anos em uma área rural no Quênia (SIEKMANN et al, 2003).

Esses estudos mostram que após a fortificação das farinhas, a deficiência de folato deixou de ser um problema de saúde pública, exceto na Índia onde ainda são observadas prevalências de deficiência de folato superiores a 5%.

Quadro 3. Prevalência de deficiência de folato em crianças de diferentes países.

Autor	Ano	Origem (País)	Tipo de estudo	Tamanho da amostra	Material Biológico	Método de análise laboratorial	Ponto de corte para deficiência	Idade	Prevalência
Strand, et al,	2018	Nepal	Transversal	500	Plasma	Ensaio Microbiológico	<10 nmol/L	2 a 11 meses	0%
Strand et al,	2013	Índia	Transversal	650	Plasma	Ensaio Microbiológico	<5 nmol/L	12 a 18 meses	15,5%
Cuevas-Nasu et al,	2012	México	Transversal	2.099	Plasma	Imunoensaio enzimático competitivo	<10 nmol/L	1 a 6 anos	3,20%
Jones et al,	2007	Guatemala	Transversal	304	Plasma	Radioensaio	<6,8 nmol/L	1 ano	0%
Taneja et al,	2007	Índia	Ensaio Clínico Randomizado	2.482	Plasma	Ensaios Microbiológicos	<5 nmol/L	6 a 30 meses	15%
Siekmann, et al	2003	Quênia	Ensaio Clínico Randomizado	555	Plasma	Radioimunoensaio	<6,8 nmol/L	5 a 14 anos	0%

No Brasil, o Ministério da Saúde passou a fortificar farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico em 2002, por meio da resolução nº 344, de 13 de dezembro de 2002, considerando que o ácido fólico reduz o risco de malformações congênitas de fechamento do tubo neural, e que as farinhas de trigo e as farinhas de milho são largamente consumidas pela população brasileira (BRASIL, 2002). No **Quadro 4** foram sintetizadas as informações de estudos que avaliaram a prevalência da deficiência de folato em crianças em diferentes regiões do Brasil.

Silva et al (2018) ao avaliarem o estado de folato em crianças de 11 a 15 meses de 4 cidades diferentes (Goiânia, Olinda, Rio Branco e Porto Alegre), observaram que 0,9% (n=460) delas tinham deficiência (<10 nmol/L) de folato e que 30,9% das crianças tinham concentrações elevadas de folato (≥50 nmol/l) (SILVA et al, 2019).

Cobayashi et al (2015) observaram que 2,6% (n=988) de crianças da região amazônica menores de 10 anos tinham deficiência de folato (<10 nmol/L) e que essa prevalência era maior (4,1%) entre as crianças menores de 2 anos (COBAYASHI et al, 2015). Já Lander et al (2012) ao investigarem o estado de micronutrientes em pré-escolares que frequentavam creches em Salvador, identificaram que a deficiência de folato (<6,8 nmol/L) era nula entre as crianças (LANDER et al, 2014).

Cardoso et al (2012) observaram que 2,5% (n=1.111) das crianças acreanas de 6 meses a 10 anos tinham deficiência de folato (<10 nmol/L) (CARDOSO et al, 2012). Garcia et al (2011) observaram que 2,2% (n=164) das crianças acreanas tinham deficiência de folato (<6,8 nmol/L) (GARCIA et al, 2011).

Poucos estudos avaliaram a prevalência da deficiência de folato em crianças brasileiras, e pesquisas com crianças em idade pré-escolar, grupo em maior risco de deficiência, são escassas (PFEIFFER et al, 2015). No entanto, parece que a política de fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico foi efetiva no Brasil, sendo observadas prevalências de deficiência de folato menores que 3% em crianças.

Quadro 4. Descrição da prevalência de deficiência de folato em crianças brasileiras.

Autor	Ano	Município (UF)	Desenho do estudo	Tamanho amostral	Material Biológico	Método de análise laboratorial	Ponto de corte para deficiência	Idade	Prevalência
Silva et al,	2019	Goiânia (GO); Olinda (PE); Rio Branco (AC); Porto Alegre (RS)	Transversal	460	Plasma	Fluoroimunoensaio	<10 nmol/L	11 a 15 meses	1%
Cobayashi et al,	2015	Acrelândia (AC)	Transversal	988	Soro	Fluoroimunoensaio	<10 nmol/L	Até 10 anos	2,60%
Lander et al,	2013	Salvador (BA)	Transversal	357	Plasma	Ensaios Microbiológicos	<6,8 nmol/L	3 a 6 anos	0%
Cardoso et al,	2012	Acrelândia (AC)	Transversal	1.111	Plasma	Fluoroimunoensaio	<10 nmol/L	0,5 a 10 anos	2,5%
Garcia et al,	2011	Acrelândia (AC)	Transversal	164	Plasma	Fluoroimunoensaio	<6,8 nmol/L	0,5 a 2 anos	2,2%

2.2.5 Altas concentrações de folato

As concentrações séricas/plasmáticas de folato, que refletem o estado atual desta vitamina, podem ser observadas em pessoas com elevado consumo de alimentos fortificados. Apesar do excesso deste micronutriente não estar relacionada a efeitos tóxicos, sabe-se que o folato está envolvido em vários mecanismos biológicos com implicações significativas para a saúde e para as doenças (PFEIFFER et al, 2015).

Desta forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS), por meio do Sistema de Informação Nutricional de Vitaminas e Minerais, definiu que concentrações séricas/plasmáticas de folato maiores que 45,3 nmol/L (>20 ng/mL) são consideradas elevadas (WHO, 2015). Vale ressaltar, que esse ponto de corte não foi estabelecido devido às implicações para a saúde, mas com base na capacidade de limite superior do ensaio sem diluições (BAILEY et al, 2020; WHO, 2015).

É sabido que o corpo humano possui um mecanismo para converter o ácido fólico, presente nas farinhas de trigo e milho e em suplementos alimentares, em uma forma reduzida e natural de folato (PFEIFFER et al, 2015). Contudo, devido à capacidade limitada do intestino humano de reduzir e metilar o ácido fólico (PATANWALA et al, 2014) estudos têm observado que pessoas que têm ingestão excessiva de ácido fólico, apresentam concentrações de ácido fólico não metabolizado (UMFA) no soro, inclusive em crianças (MARUVADA et al, 2020; PFEIFFER et al, 2015; SWEENEY et al, 2005). No entanto, as implicações decorrentes das altas concentrações de folato e/ou UMFA ainda são desconhecidas (MARUVADA et al, 2020).

Um estudo experimental com ratas, cujo objetivo era entender como altas concentrações de ácido fólico induzia disfunção metabólica na prole, observou que a exposição a altas concentrações de ácido fólico afeta o fenótipo predispondo a um estado de resistência à insulina (KEATING et al, 2015). Em uma coorte de nascimento na Índia observou que altas concentrações maternas de folato estavam associadas com resistência à ação da insulina em crianças aos 9 e 13 anos (KRISHNAVENI et al, 2014).

Moen et al (2021), em um estudo realizado no Reino Unido, encontraram um efeito causal positivo entre altas concentrações séricas maternas de folato com peso ao nascer de seus filhos. O aumento de 1 desvio padrão nas concentrações de folato aumentava em 71g o peso ao nascer das crianças (MOEN et al, 2021). Algumas revisões da literatura relataram que alterações nas concentrações folato foram associadas a alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e condições neurológicas (MARUVADA et al, 2020; PFEIFFER et al, 2015).

2.2.6 Altas concentrações de folato *vs.* baixas concentrações de vitamina B12

As vitaminas B12 e folato possuem uma estreita relação metabólica. Dessa forma, considerando que a deficiência de vitamina B12 ainda é um problema de saúde pública em muitos países em desenvolvimento e que pode haver uma ingestão excessiva de ácido fólico, especialmente em países onde há fortificação obrigatória de alimentos; a interação entre essas vitaminas tem sido investigada (BAILEY et al, 2020; COLAPINTO et al, 2016; PEREIRA et al, 2017; SELHUB; ROSENBERG, 2016).

Selhub et al (2009) ao avaliarem a interação entre altas concentrações de folato e baixos níveis de vitamina B12 no desenvolvimento de anemia e comprometimento cognitivo em idosos, observaram que quando os níveis plasmáticos de vitamina B12 são adequadas (>150 pmol/L), o aumento do folato plasmático está associado à uma diminuição da homocisteína plasmática e nenhuma alteração nas concentrações plasmáticas de MMA. No entanto, quando há deficiência de vitamina B12 e excesso de folato, ocorre aumento substancial destes metabólitos (SELHUB et al, 2009).

Morris et al (2007) observaram que os participantes idosos da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição dos Estados Unidos de 1999-2002 que tinham deficiência de vitamina B12 e excesso de folato (> 59 nmol/L) apresentavam anemia (OR: 3,1; IC 95%: 1,5, 6,6) e comprometimento cognitivo (OR: 2,6; IC 95%: 1,1, 6,1) (MORRIS et al, 2007). Moore et al (2014) observaram que idosos com deficiência de vitamina B12 e níveis elevados de folato eritrocitário eram mais propensos a ter desempenho cognitivo prejudicado (MOORE et al, 2014).

Selhub e Rosenberg (2016) em um artigo de revisão relataram que concentrações elevadas de folato estão associadas com a intensificação dos sinais clínicos (anemia megaloblástica e comprometimento cognitivo) e bioquímicos (aumento de MMA e Homocisteína) decorrentes da deficiência de vitamina B12 (SELHUB; ROSENBERG, 2016).

Um estudo realizado com adultos franceses obesos (IMC ≥35 kg/m2) observou que pacientes com baixas concentrações de vitamina B12 e baixas concentrações séricas de folato ou altas concentrações séricas de folato tinham altas concentrações de MMA e que folato eritrocitária, homocisteína e MMA predizem resistência à insulina na obesidade grave (LI et al, 2018).

Yajnik et al (2008) ao avaliarem a associação entre as concentrações de vitamina B12, folato e homocisteína materna durante a gestação, e a adiposidade e resistência à insulina em crianças de 6 anos, concluíram que a deficiência de vitamina B12 e elevadas concentrações de

folato durante a gestação podem contribuir para a adiposidade e diabetes tipo 2 em crianças indianas (YAJNIK et al, 2008).

Krishnaveni et al (2009) observaram que a deficiência materna de vitamina B12 estava associada ao aumento da adiposidade e, por sua vez, ao aumento da resistência à insulina e diabetes gestacional especialmente na presença de altas concentrações de folato (KRISHNAVENI et al, 2009).

Já Behere e Yajnik (2021) relatam que baixas concentrações de vitamina B12 e altas concentrações de folato no início da vida podem afetar negativamente os processos de neurodesenvolvimento e o metabolismo endócrino (BEHERE et al, 2021).

Braun et al (2015) observaram interação significativa entre sexo e ingestão de vitamina B12, folato e metionina com a altura e peso, mas não observou essa interação com IMC e gordura corporal em crianças holandesas com 6 anos de idade (BRAUN et al, 2015).

Contudo, Mills et al (2011) ao investigarem o efeito do desequilíbrio entre altas concentrações séricas de folato e baixas concentrações de vitamina B12 nos indicadores metabólicos relacionados ao estado da vitamina B12 em estudantes universitários, observaram que as altas concentrações de folato não foram associadas a maiores concentrações de homocisteína e MMA (MILLS et al, 2011).

No Brasil, Silva et al (2019) ao avaliarem a associação entre concentrações séricas/ plasmáticas de folato e vitamina B12 com anemia em crianças brasileiras de 11 a 15 meses, observou que, 30,9% (n=460) das crianças tinham concentrações elevadas de folato e 15% tinham deficiência de vitamina B12 e 4,7% das crianças tinham baixa estatura para idade (SILVA et al, 2019).

As evidências até o presente momento sugerem que a deficiência de vitamina B12 e o excesso de folato estão associados a resultados negativos de saúde em crianças. Assim, mais estudos são necessárias para demonstrar de forma mais robusta a interação entre esses micronutrientes (PAUL; SELHUB, 2017).

2.2.7 Hipóteses sobre a relação entre altas concentrações de folato e baixas concentrações de vitamina B12

Atualmente, existem algumas hipóteses que foram levantadas para justificar a interação desses micronutrientes. A mais aceita é a armadilha de metilfolato (SMULDERS et al, 2006), e a mais atual sugere o esgotamento do transportador de vitamina B12 (holoTc) (SELHUB et al, 2022). A seguir será apresentada breve descrição de cada uma dessas hipóteses.

Armadilha de metilfolato. Essa hipótese trabalha com o aprisionamento do grupo metila. Na deficiência de vitamina B12, a metionina sintase fica com a sua função reduzida o que impossibilita o 5-MTHF de doar o grupamento metil. Assim, não há a conversão do 5-MTHF em tetraidrofolato ocasionando um comprometimento na biossíntese de DNA e divisão celular. Como a metilação da homocisteína fica prejudicada, os níveis de SAM ficam baixos e isso estimula a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), que é responsável pela redução do metilenotetrahidrofolato a 5-MTHF. Assim as células sofrem uma falsa deficiência de folato, pois mesmo estando presente na célula, ele fica sob uma forma que não participa do ciclo de metilação e nem da biossíntese de DNA (SMULDERS et al, 2006) (**Figura 3**).

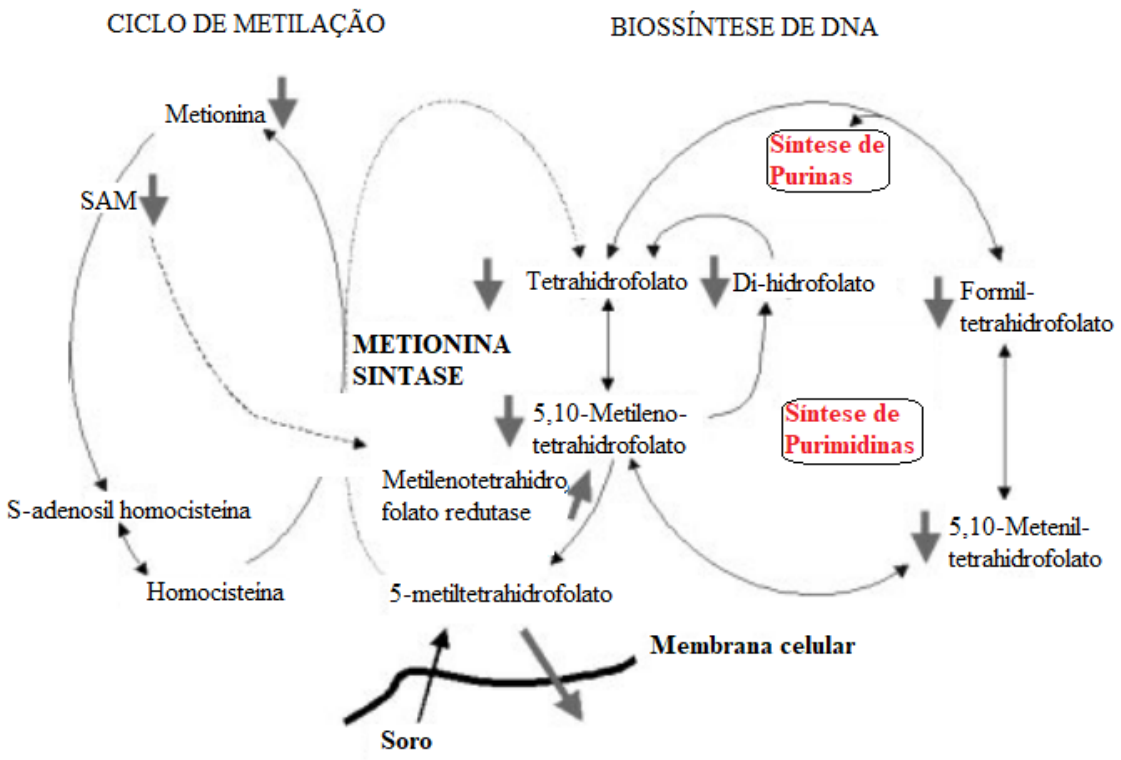


Figura 3. Metabolismo de folato segundo a hipóteses de armadilha de metilfolato.
Fonte: Traduzido e adaptado de SMULDERS et al, 2006

Esgotamento do transportador de vitamina B12 (holoTC). Essa hipótese sugere que quando há ingestão excessiva de ácido fólico, há diminuição específica da forma ativa da vitamina B-12 transportável no soro, a holoTC. Na deficiência de vitamina B12 e exposição a altas concentrações de folato, o ácido fólico se liga a seus receptores na medula óssea e nas células do tubo proximal, e isso ocasiona um desvio do pouco complexo holoTC que está no soro para (1) apoiar a hematopoiese mediada por ácido fólico e/ou (2) ser filtrada nos rins e

eliminada na urina. Assim, a B12 que deveria ir para outros tecidos, como fígado e cérebro, é desviada. Esse esgotamento do complexo holoTC contribui para elevação de homocisteína e MMA no soro, e consequentemente com o comprometimento cognitivo (SELHUB et al, 2022) (**Figura 4**).

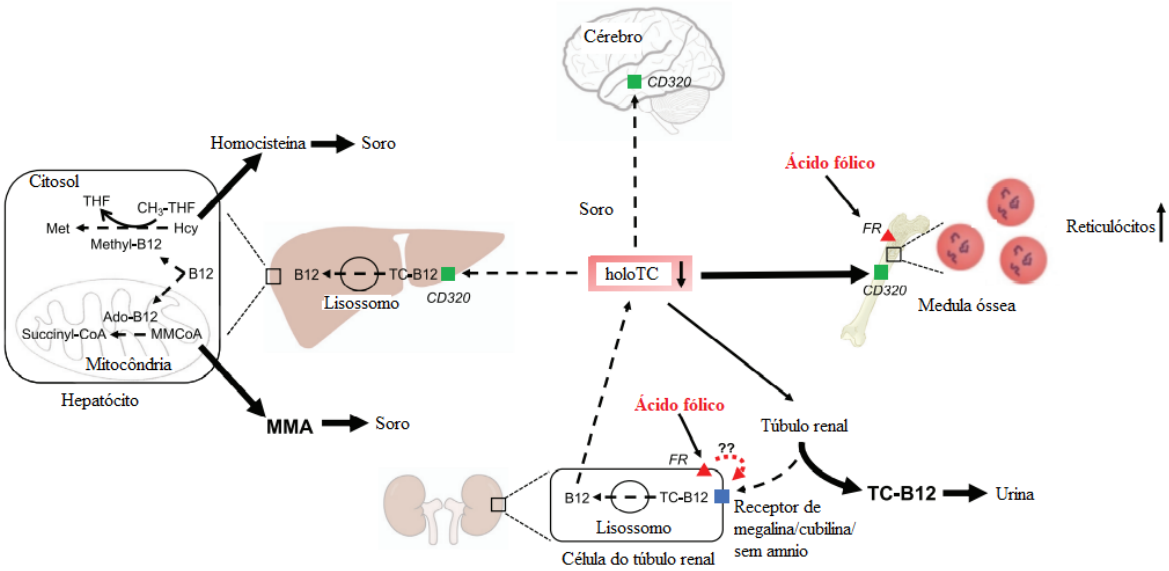


Figura 4. Efeito hipotético de altas concentrações de folato na deficiência de vitamina B12.
Fonte: Traduzido e adaptado de SELHUB et al, 2022.

A partir das evidências apresentadas, é possível observar que existe uma ampla discussão na literatura sobre a interação entre a vitamina B12 e o folato. Além disso, parece que essa interação é diferente de acordo com a idade da população estuda, o consumo alimentar e fatores socioeconômicos. Dessa forma, mais estudos são necessários para esclarecimento das lacunas existentes.

3. JUSTIFICATIVA

A deficiência de vitamina B12 e de folato está associada ao atraso no crescimento e desenvolvimento cognitivo, e ao baixo desempenho escolar entre a primeira infância e a adolescência. Dessa forma, é importante o monitoramento do estado desses micronutrientes na infância. Além disso, estudos têm demonstrado que elevadas concentrações séricas de folato, oriundos principalmente da fortificação das farinhas de trigo e milho, podem agravar a deficiência de vitamina B12.

Contudo, apesar da relevância desses micronutrientes para o crescimento e desenvolvimento infantil adequado, não existem estudos que tenham avaliado o estado nutricional dessas vitaminas em crianças brasileiras.

Dessa forma, os dados do presente estudo possibilitarão conhecer o estado nutricional de vitamina B12 e folato em crianças brasileiras entre 6 e 59 meses, e investigar a associação entre altas concentrações de folato e deficiência de vitamina B12, e a relação dessas vitaminas com o crescimento infantil. Além disso, esse trabalho pode contribuir para atualização e proposição de políticas públicas e programas de alimentação, nutrição e saúde direcionadas às crianças brasileiras.

4. HIPÓTESE

I. A prevalência da deficiência de vitamina B12 e folato é diferente de acordo com a idade, macrorregiões e condições socioeconômicas em crianças brasileiras entre 6 e 59 meses.

II. Altas concentrações séricas de folato estão diretamente associadas à deficiência de vitamina B12 em crianças brasileiras entre 6 e 59 meses.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Descrever o estado nutricional de vitamina B12 e de folato, e estimar a direção e magnitude da associação entre altas concentrações de folato e deficiência de vitamina B12.

5.2 Objetivos Específicos

i. Estimar a prevalência de deficiência de vitamina B12 e altas concentrações de folato para o Brasil e de acordo com fatores demográficos, socioeconômicos e consumo alimentar;

ii. Estimar a direção e magnitude da associação entre altas concentrações de folato e a deficiência da vitamina B12 em crianças brasileiras entre 6 e 59 meses de idade;

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Desenho do estudo

O presente trabalho trata-se de um estudo transversal realizado a partir de dados do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-19), inquérito populacional de base domiciliar realizado em uma amostra probabilística de crianças menores de 5 anos de idade distribuídas em 123 municípios dos 26 Estados da Federação e no Distrito Federal. O ENANI-2019 tinha como objetivo avaliar as práticas de aleitamento materno e de alimentação complementar, o consumo alimentar, o estado nutricional antropométrico infantil e materno, e deficiência de micronutrientes (hemoglobina, vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina B1, vitamina B6, vitamina B12, folato, zinco, selênio e ferritina) em crianças brasileiras menores de 5 anos. Na presente dissertação, foram utilizadas informações de crianças brasileiras entre 6 e 59 meses de idade.

6.2 População de estudo

A amostra do ENANI-2019 foi constituída pelo subconjunto de domicílios pesquisados pela Pesquisa Nacional por Amostragem de Domicílios do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (BRASIL, 2012), nos quais residia pelo menos um morador com idade inferior a cinco anos. Os municípios, foram estratificados por macrorregião, e em cada região, por município com mais de 500 mil habitantes, assim 47 municípios foram incluídos. Posteriormente, para cada uma das cinco regiões, foi criado o estrato com os demais municípios, formando 52 estratos de seleção. Desta forma, os municípios foram selecionados com probabilidade proporcional à sua população de menores de cinco anos, ou seja, quanto maior essa população maior a chance de ser selecionado. O tamanho da amostra foi calculado em 15.000 domicílios, ou 1.500 setores, de 123 municípios de todos os estados brasileiros.

O plano amostral foi desenvolvido pela Sociedade para o Desenvolvimento da Pesquisa Científica (Science) que também foi responsável pela operacionalização e coleta dos dados de campo. Para assegurar o tamanho calculado da amostra, os domicílios de cada setor foram selecionados pelo método sequencial conhecido como amostragem inversa (HALDANE, 1945; VASCONCELLOS; SILVA; ANJOS, 2013; VASCONCELLOS; SILVA; SZWARCWALD, 2005), que consiste em determinar de forma aleatória os endereços a serem visitados para verificar se o domicílio era elegível (ter morador com menos de cinco anos) e realizar a tentativa de entrevista. Esse procedimento sequencial, definido pelo Sistema de Atualização de

Endereços do Setor (SAES), terminou com a obtenção da décima entrevista realizada em domicílio elegível ou quando todos os domicílios do setor foram visitados, com qualquer número de entrevistas realizadas.

Não fizeram parte da população alvo as crianças de populações indígenas que moravam em aldeias; as estrangeiras residentes em domicílios brasileiros que não falam a língua portuguesa; as portadoras de condição que as incapacite à medição antropométrica, bem como as crianças moradoras em domicílios coletivos (hotéis, pensões e similares, orfanatos e hospitais). Ao final do estudo, foram avaliadas 14.583 crianças menores de 59 meses (ALVES-SANTOS et a, 2021).

Para a presente dissertação, serão avaliadas apenas crianças com idade entre 6 e 59 meses, faixa-etária elegível para coleta de sangue. Crianças menores de seis meses não foram eram elegíveis para a coleta de sangue no ENANI-2019 devido à maior dificuldade na realização da punção venosa e ao maior risco de intercorrências após coleta (por exemplo, hematoma). Dentre as 12.618 crianças entre 6 e 59 meses, 8.829 realizaram coleta de sangue e 7.418 tinham dosagens de vitamina B12 e folato. Crianças com informações de peso para idade ou altura para idade faltantes (n=1) também foram excluídas da análise. Sendo assim, a amostra final do estudo incluiu 7.417 crianças brasileiras de 6 a 59 meses (**Figura 5**).

Devido as perdas (não respostas) para os dados de biomarcadores sanguíneos, foram feitos ajustes dos pesos básicos das crianças do ENANI-2019, considerando variáveis preditoras para não resposta (CASTRO et a, 2021; VASCONCELLOS et al, 2021). Dessa forma, a amostra final é representativa para macrorregiões brasileiras, faixas etárias e sexo de crianças brasileiras entre 6 e 59 meses.

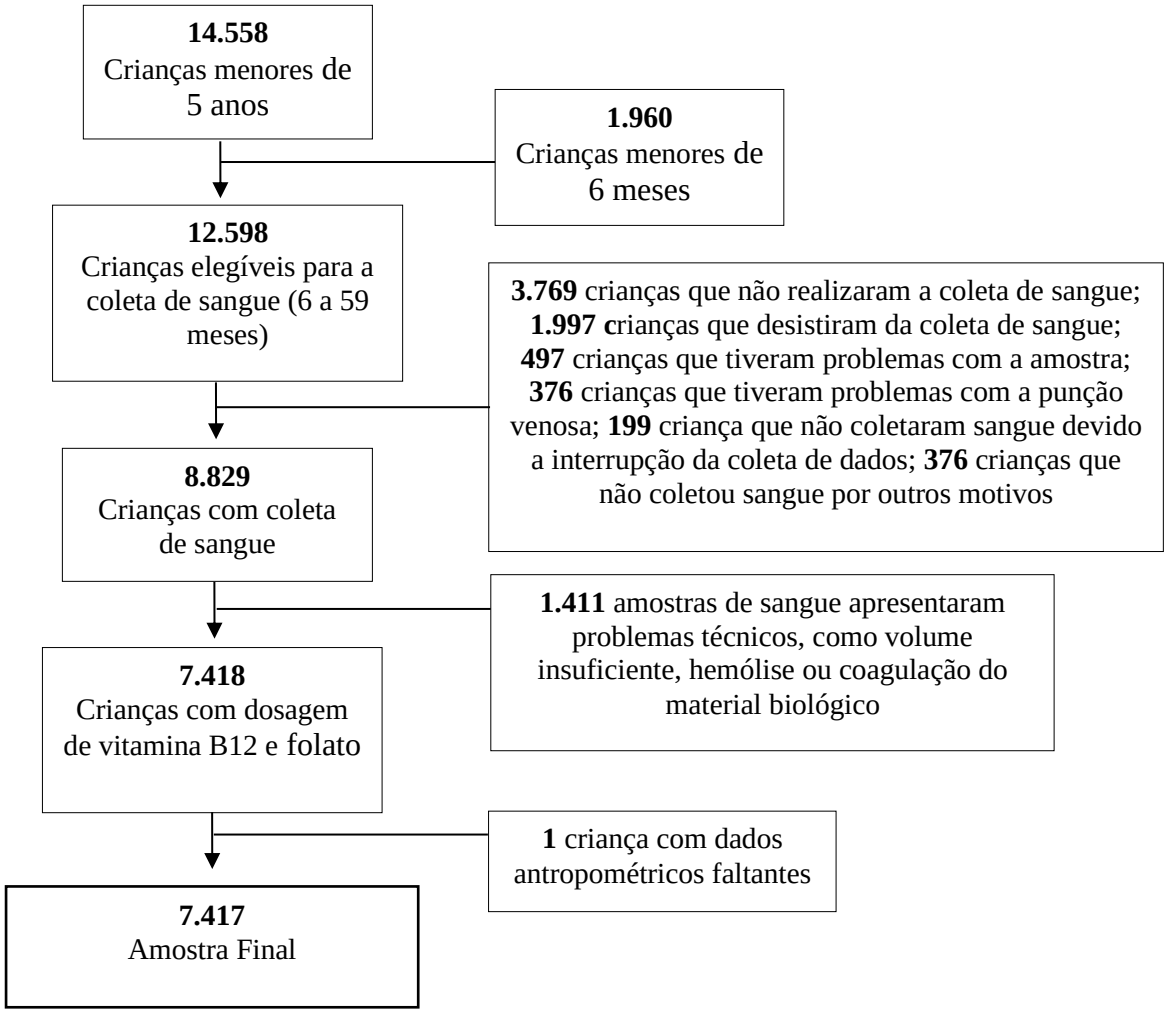


Figura 5. Fluxograma da população de estudo.

6.3 Coleta de dados

Os entrevistadores, adequadamente treinados, foram responsáveis pelas visitas aos domicílios, pela obtenção do consentimento das famílias, pelo registro das respostas dos informantes, pela realização da avaliação antropométrica, e pelo agendamento e acompanhamento dos responsáveis pela coleta de sangue nos domicílios. A coleta de dados de todas as informações do questionário geral e da coleta de sangue foram registradas em um *tablet,* com um aplicativo desenvolvido para o estudo utilizando o *software Census Survey Processing System (CSPro).*

Os dados gerais do ENANI foram coletados em duas etapas: (I) na primeira visita ao domicílio foi apresentado o estudo à família, obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aplicados o questionário geral e o recordatório de 24h, e realizada a avaliação antropométrica da mãe biológica e das crianças com idade superior a dois anos; (II)

na segunda visita ao domicílio foi realizada a avaliação antropométrica das crianças com idade inferior a dois anos e a coleta de sangue das crianças com idade igual ou superior a seis meses (**Figura 7**).

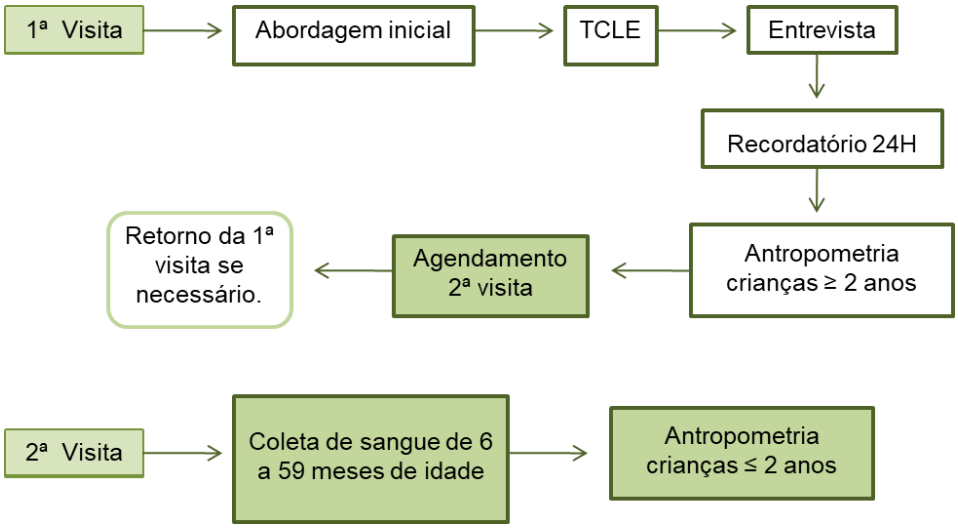


Figura 6. Fluxograma da coleta de dados gerais do ENANI-2019.
Nota: TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

6.4 Análises laboratoriais

6.4.1 Coleta sangue

A coleta de sangue foi realizada no domicílio em data previamente agendada, por profissionais qualificados com experiência em coleta de sangue infantil. O laboratório central de análises clínicas Diagnósticos do Brasil foi responsável pela (1) seleção e recrutamento dos laboratórios parceiros, que realizam as coletas de sangue nos 123 municípios selecionados; (2) organização do processo de coleta domiciliar de sangue; (3) transporte das amostras biológicas, e (4) execução das análises laboratoriais.

Os laboratórios parceiros credenciados ao laboratório Diagnósticos do Brasil foram responsáveis pela coleta de sangue domiciliar. O entrevistador do estudo agendou previamente com o laboratório a data da coleta de sangue, e no dia e horário agendado, o entrevistador e o coletador foram ao domicílio da criança. O entrevistador auxiliou o coletador a segurar a criança no momento da coleta de sangue. Foram coletadas 8 mL de sangue de cada criança, distribuídos 6 mL em tubo trace e 2 mL em tubo EDTA. Imediatamente após a coleta de sangue, ambos os tubos eram homogeneizados por inversão e o tubo trace foi envolvido em papel alumínio para

garantir a estabilidade das amostras para as análises. O material era transportado ao laboratório em estante dentro de uma caixa térmica, com temperatura de 2ºC a 8ºC (**Figura 8**).

No laboratório parceiro, o tubo trace era centrifugado por 10 minutos a 3.000 r.p.m. para separação do soro, que era transferido para outro tubo trace envolto em papel alumínio e acondicionado em temperatura de congelamento. Eram transferidos 0,5mL de sangue total do tubo EDTA para um tubo âmbar, que também era acondicionado em temperatura de congelamento, e o restante do volume de sangue total do tubo EDTA era mantido em refrigeração (2ºC a 8ºC). Os materiais biológicos eram enviados ao laboratório Diagnósticos do Brasil de acordo com a sua temperatura de acondicionamento (refrigerado ou congelado) para a realização das análises laboratoriais.

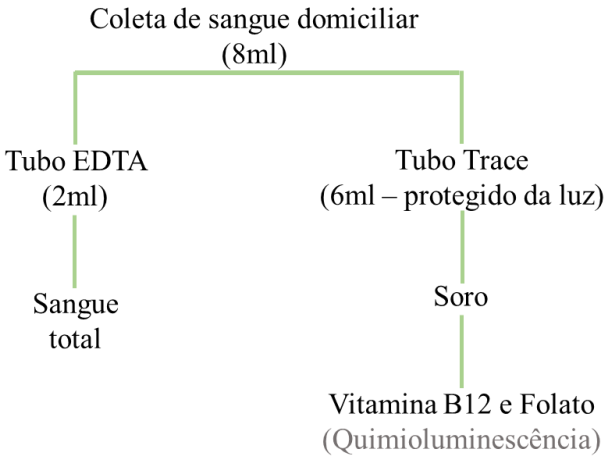


Figura 7. Fluxo das análises laboratoriais.

6.4.2 Determinação das concentrações de folato e vitamina B12

As concentrações de folato e vitamina B12 no soro foram determinadas por ensaio imunoenzimático por quimiluminescência (DxI 800, Beckman Coulter, EUA)(CASTRO et al, 2021). Foram classificadas como deficientes as crianças com concentrações séricas de folato inferiores a 10 nmol/L (equivalente a 4 ng/mL) (WHO, 2015; PFEIFFER et al, 2015) e de vitamina B12 inferiores a 150 pmol/L (DE BENOIST, 2008). Concentrações séricas de folato acima de 45,3 nmol/L foram consideradas elevadas (WHO, 2015).

6.5 Covariáveis

Informações como região do Brasil onde residia (Norte, Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste), idade das crianças, escolaridade materna, Indicador Econômico Nacional (IEN),

uso de suplemento vitamínico com vitamina B12 ou ácido fólico nos últimos 6 meses, consumo de alimentos fontes de folato ou vitamina B12 no dia anterior a entrevista e consumo de alimentos ultraprocessados foram obtidas por meio do questionário geral.

Uma versão atualizada do IEN, a partir dos dados do ENANI-2019, foi utilizada para classificar a situação econômica das famílias, mais detalhes sobre o cálculo do IEN podem ser obtidos primeiro relatório do ENANI-2019 (UFRJ, 2021). O IEN foi desenvolvido como alternativa ao uso direto da renda familiar e incorpora um conjunto de itens relacionados à posse de bens de consumo, às características do domicílio e à escolaridade do chefe do domicílio (BARROS; VICTORA, 2005; EWERLING; BARROS, 2017).

6.6 Análises estatísticas

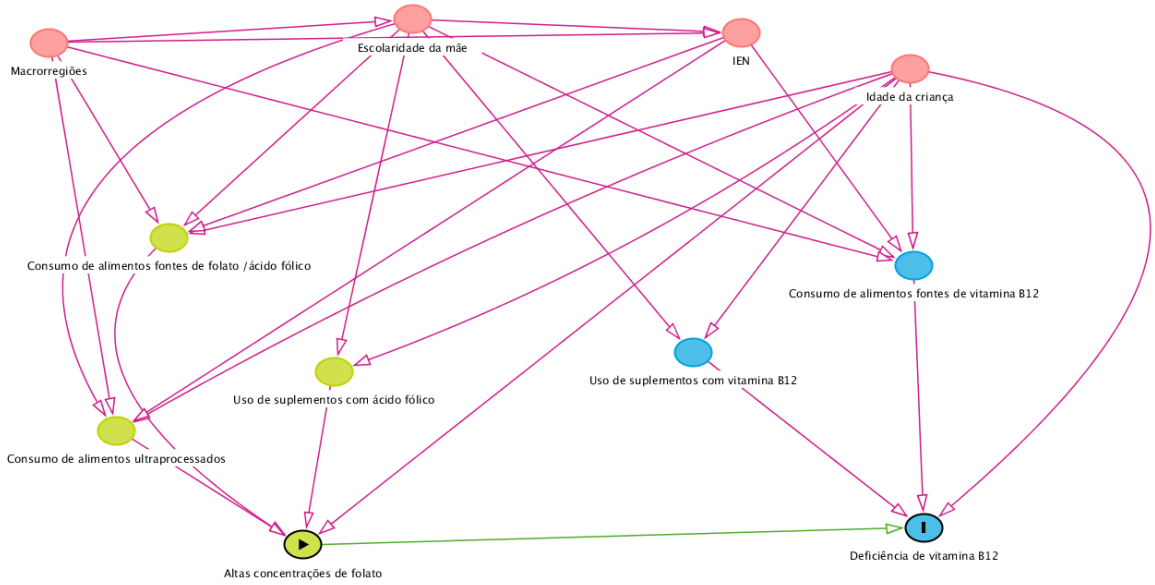
As análises desta dissertação referem-se a um subconjunto da população alvo do ENANI-2019, crianças de 6 a 59 meses com informações de vitamina B12, folato e peso para idade e estatura/comprimento para idade. Desta forma, foram feitos ajustes dos pesos básicos das crianças, que considerou ainda os casos de não resposta (falta de medidas para os parâmetros bioquímicos) e imputação (falta de medidas antropométricas) (ANJOS et al, 2021).

Foram calculadas as estimativas pontuais e intervalos de confiança de 95% das prevalências para o Brasil e segundo macrorregiões, faixa etária (6 a 23; 24 a 59 meses), escolaridade da mãe (0 a 7 anos; 8 a 10 anos; 11 anos; 12 ou mais anos), tercis do IEN, uso de suplemento com vitamina B12 (sim e não), consumo de alimentos fontes no dia anterior (sim e não) e consumo de alimentos ultraprocessados (0; 1 ou 2 grupos; 3 ou mais grupos)**.**

Adicionalmente, foram calculados o coeficiente de variação (CV) e a estimativa do total populacional de crianças brasileiras de 6 a 59 meses com cada condição (crianças x 1000). O CV é obtido a partir da razão entre o erro padrão e o valor estimado do indicador, e é utilizado como uma medida de homogeneidade do conjunto de dados. Vale ressaltar, que estimativas com CV elevado apresentam baixa precisão. Assim, estabeleceu-se CV inferior a 30% como nível de precisão adequado para as tabulações dos indicadores e das variáveis avaliadas (dados não apresentados).

Foi considerada diferença estatisticamente significativa a ausência de sobreposição de intervalos de confiança de 95% (IC 95%) de proporções ou medianas dos micronutrientes.

Para estimar a magnitude da associação entre altas concentrações de folato e a deficiência de vitamina B12 foram construídos modelos de regressão logística brutos e ajustados, estimando os valores de razão de chances (OR) e IC 95%. A seleção das variáveis (idade, escolaridade da mãe, consumo de alimentos fontes no dia anterior e consumo de alimentos ultraprocesados) para ajuste do modelo consideraram a plausibilidade biológica das associações e a construção de diagrama acíclico não direcionado (DAG) (**Figura 9**). Todas as análises foram realizadas com o software R, e utilizadas as funções dos pacotes *srvyr* e *survey*, considerando a estrutura do plano amostral, os pesos e a calibração amostral.



Legenda:

Exposição Desfecho Variável ancestral da exposição Variável ancestral do desfecho

Variável ancestral a exposição e ao desfecho Caminho com viés Caminho causal

Figura 8. Diagrama acíclico não direcionado entre altas concentrações de folato e deficiência de vitamina B12.

Nota: Conjunto de variáveis de ajuste mínimo sugerido para estimar o efeito total de altas concentrações séricas de folato na deficiência de vitamina B12: idade da criança, consumo de alimentos fontes, escolaridade materna, consumo de alimentos ultraprocessados.

6.7 Questões Éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ, registrado sob o CAAE: 89798718.7.0000.5257. O estudo encontrava-se de acordo com o que está disposto na

Resolução nº 466/2012 sobre o cumprimento dos princípios da não maleficência, beneficência, justiça e equidade. Após esclarecimentos sobre o estudo, os responsáveis legais pelos menores de cinco anos que aceitaram participar da pesquisa assinaram, espontaneamente, duas vias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Todos os participantes do estudo tiveram acesso aos resultados de exames de sangue e antropométricos, por meio do site do ENANI, por e-mail ou correios. Caso a criança tivesse algum agravo nutricional (desnutrição, obesidade, anemia e hipovitaminose A), ela era encaminhada para tratamento na rede pública de saúde.

7. RESULTADOS

***Artigo**: High serum folate concentration and vitamin B12 deficiency in Brazilian children aged 6 to 59 months: data from the ENANI-2019*

Abstract

Background: Vitamin B12 and folate are key nutrients to adequate child growth, but little is known about the status of these vitamins in Brazilian children under 5 years of age. **Aim:** To describe the prevalence of vitamin B12 and folate deficiencies and high folate serum concentration in Brazilian children aged 6 to 59 months and evaluate the association between high folate concentration and vitamin B12 deficiency. **Methods:** Data from the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019) were used. Data from 7,417 children aged 6 to 59 months who have information on vitamin B12, and folate serum concentrations were analyzed. Children with serum concentrations of vitamin B12 <150 pmol/L and folate <10 nmol/L were classified as having deficiency. Children with serum folate >45.3nmol/L were classified as having high folate concentrations. Statistical analysis included logistic regression models, reporting odds ratio (OR), and 95% confidence interval (95%CI). **Results:** In Brazil, 14.2% (95%CI: 12.2; 16.1) of children aged 6 to 59 months had vitamin B12 deficiency, 1.1% (95%CI: 0.5; 1.6) had folate deficiency and 36.9% (95%CI: 33.4; 40.3) had high folate concentrations. A high prevalence of vitamin B12 deficiency was observed in children from the North region of Brazil, between 6 and 24 months, with mothers with lower formal education (0-7 years of schooling) and classified in the lower tertile of the national wealth index. Children with high folate serum concentrations had a 59% lower chance (OR: 0.41; 95%CI: 0.30; 0.57) of having vitamin B12 deficiency compared with children without high concentrations. **Conclusion:** Vitamin B12 deficiency is a public health problem in Brazilian children aged 6-59 months, and only 1.1% of children had folate deficiency. More than three out of ten children had high serum folate concentrations, and high folate concentration were inversely associated with vitamin B12 deficiency. Public health interventions should focus on younger children, of vulnerable socioeconomic status and from the North region of Brazil.

Introdução

A vitamina B12 e o folato (vitamina B9) são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento adequados durante a infância (BAILEY et al, 2015; DARNTON-HILL, 2019). A deficiência dessas vitaminas está associada a desfechos adversos como malformações congênitas de fechamento do tubo neural, prematuridade, baixo peso ao nascer, e déficits no crescimento e desenvolvimento cognitivo na infância (ALLEN et al, 2018; BAHADIR et al, 2014; BRAUN et al, 2015; COBAYASHI et al, 2015; WHO, 2015; PFEIFFER et al, 2015; SOLOMON, 2013).

A deficiência de vitamina B12 em crianças tem sido considerada um problema de saúde pública global (ALLEN et al, 2018; DARNTON-HILL, 2019). Estudos têm observado prevalências que variaram de 1,6%, na Colômbia em crianças de 5 a 12 anos, a 49,0% na Guatemala em crianças de 1 ano (JONES et al, 2007; SHENG et al, 2019). No Brasil, há poucos estudos que avaliaram a prevalência da deficiência de vitamina B12 (CARDOSO et al, 2012; COBAYASHI et al, 2015; GARCIA; GRANADO; CARDOSO, 2011; LANDER et al, 2014; SILVA et al, 2019). Silva et al. avaliaram crianças de 11 a 15 meses de 4 cidades brasileiras, e observaram que 15,0% tinham deficiência dessa vitamina (SILVA et al, 2019) e Cobayashi et al. observaram que 13,6% das crianças menores de 2 anos, que moravam no Norte do Brasil tinham deficiência de vitamina B12 (COBAYASHI et al, 2015).

O folato, sob a forma de ácido fólico, é adicionado a farinhas de trigo e milho em 80 países, incluindo o Brasil, como política pública para diminuir o risco de malformações congênitas de fechamento de tubo neural durante a gestação (BRASIL, 2002; BRITO et al, 2015; PFEIFFER et al, 2015). Dessa forma, após a fortificação das farinhas, a deficiência de folato parece não ser um problema de saúde pública em países da América Latina, nos quais são observadas prevalências de deficiência desse micronutriente inferiores a 5% (BRITO et al, 2015). Por outro lado, estudos têm observado altas concentrações de folato (>11 nmol/L) em indivíduos adultos de diferentes regiões do mundo, como Estados Unidos e Canadá (BAILEY et al, 2020; COLAPINTO; O'CONNOR; TREMBLAY, 2011). Existem poucos estudos com crianças, mas altas concentrações (> 45 nmol/L) desse nutriente também foram descritas nesse grupo (SILVA et al, 2019).

Adicionalmente, devido a estreita relação bioquímica entre o folato e a vitamina B12, estudos têm avaliado o possível impacto de alta ingestão de ácido fólico nas concentrações séricas de vitamina B12 devido a intensificação dos sinais clínicos e bioquímicos decorrentes da deficiência de vitamina B12 em indivíduos adultos e idosos (PAUL; SELHUB, 2017;

SOLOMON, 2013). Além disso, têm sido discutidas possíveis vias pelas quais altas concentrações de folato influenciariam o metabolismo de vitamina B12, mas ainda sem consenso na literatura (PALMER et al, 2017; SELHUB et al, 2022; SMULDERS et al, 2006).

Apesar da relevância desses micronutrientes para o crescimento e desenvolvimento infantil adequado e da possível relação entre as concentrações de folato e a deficiência de vitamina B12, não existem estudos de base-populacional com representatividade nacional que tenham avaliado o estado nutricional dessas vitaminas em crianças brasileiras. Assim, o objetivo do presente estudo é descrever o estado nutricional de vitamina B12 e de folato, e estimar a direção e magnitude da associação entre altas concentrações de folato e deficiência de vitamina B12 em crianças brasileiras entre 6 e 59 meses de idade.

Método

Desenho, amostragem e população do estudo

Trata-se de estudo transversal descritivo que utilizou dados do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019), inquérito populacional de base domiciliar realizado em uma amostra probabilística de crianças menores de 5 anos de idade distribuídas em 123 municípios dos 26 Estados da Federação e no Distrito Federal, conduzido no Brasil entre 2019 e 2020 (ALVES-SANTOS et al, 2021). O plano amostral do ENANI-2019 utilizou estratificação e conglomeração e incorporou dois ou três estágios de seleção (município ou setor censitário). Os domicílios que possuíam pelo menos uma criança menor de 5 anos foram as unidades elementares de amostragem, o que possibilitou representatividade por macrorregiões brasileiras, faixa etária e sexo (VASCONCELLOS et al, 2021).

Do total de crianças elegíveis (entre 6 e 59 meses) para a coleta de sangue (n=12.618), em 7.418 foram determinadas as concentrações séricas de vitamina B12 e folato. A amostra final do estudo incluiu 7.417 crianças brasileiras de 6 a 59 meses, devido as perdas (não respostas) para os dados de biomarcadores sanguíneos, foram feitos ajustes dos pesos básicos das crianças do ENANI-2019, considerando variáveis preditoras para não resposta (CASTRO et al, 2021; VASCONCELLOS et al, 2021) **Figura 1**).

Análises laboratoriais

Coleta sangue

A coleta de 8 mL sangue foi realizada no domicílio em data previamente agendada, por profissionais qualificados com experiência em coleta de sangue infantil. Não era necessário fazer jejum ou interromper medicações para fazer a coleta de sangue. O sangue coletado foi distribuído entre tubo EDTA (2mL) e tubo trace (6mL). O tubo trace foi envolto em papel alumínio com a finalidade de garantir a estabilidade da amostra para análise de vitamina B12. No laboratório local, o tubo trace foi centrifugado, o soro transferido para outro tubo trace envolto em papel alumínio e armazenado em temperatura de congelamento e posteriormente enviadas a um laboratório central para a realização das análises laboratoriais (CASTRO et al, 2021).

Concentrações séricas de folato e vitamina B12

As concentrações de folato e vitamina B12 no soro foram determinadas em laboratório comercial, por meio de ensaio imunoenzimático por quimiluminescência (DxI 800, Beckman Coulter, Brea, Estados Unidos) (CASTRO et al., 2021). As crianças com concentrações séricas de folato < 10 nmol/L (equivalente a 4 ng/mL) (WHO, 2015; PFEIFFER et al, 2015) e de vitamina B12 <150 pmol/L (DE BENOIST, 2008) foram classificadas como deficientes. Concentrações séricas de folato acima de 45,3 nmol/L foram consideradas altas (MORRIS et al, 2010; WHO, 2015), esse ponto de corte não foi estabelecido devido às implicações para a saúde, mas com base na capacidade de limite superior do ensaio sem diluições (BAILEY et al, 2020; WHO, 2015). Visto que não é bem estabelecido na literatura o efeito tóxico deste micronutriente (PFEIFFER et al, 2015).

Covariáveis

Foram avaliadas as seguintes características demográficas e socioeconômicas: macrorregiões brasileiras (Norte, Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste), idade da criança (6-23; 24-59 meses), escolaridade da mãe ou responsável (0-7; 8-10; 11; ≥12 anos), tercis do Indicador Econômico Nacional (IEN), variável utilizada para classificar a situação econômica das famílias (BARROS; VICTORA, 2005; EWERLING; BARROS, 2017). Também foram avaliados o uso atual de suplemento vitamínico (sim ou não), e consumo de alimentos fontes de vitamina B12 (leite, iogurte, carne, fígado, ovo e hamburguer), folato (couve, verduras, macarrão, salgadinhos, biscoitos, farinhas e alimentos industrializados) e ultraprocessados no dia anterior à entrevista (MONTEIRO et al, 2010).

Análises estatísticas

Foram calculadas as prevalências (e respectivos intervalos de confiança de 95% - IC 95%) de deficiência de vitamina B12, deficiência de folato, e altas concentrações de folato. As prevalências de deficiência de vitamina B12 e de altas concentrações de folato foram descritas para o Brasil e segundo as características socioeconômicas e demográficas listadas acima.

Para estimar a magnitude da associação entre elevadas concentrações de folato e a deficiência de vitamina B12 foram construídos modelos de regressão logística brutos e ajustados, e foram estimados os valores de razão de chances (OR) e IC 95%. A seleção das variáveis para ajuste do modelo considerou a plausibilidade biológica das associações e a construção de diagramas acíclicos não direcionados (DAG) (**Supplemental Figure 1**), que permite avaliar, em teoria, como se dão as relações causais entre as variáveis e quais configuram confundimento ao modelo, sugerindo o conjunto mínimo, mas suficiente de variáveis para ajustar a análise e remover o confundimento (CORTES; FAERSTEIN; STRUCHINER, 2016). Todas as análises foram realizadas no *software* estatístico *R*, e utilizadas as funções dos pacotes *srvyr* e *survey*, considerando a estrutura do plano amostral, os pesos e a calibração amostral. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Questões éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ, registrado sob o CAAE: 89798718.7.0000.5257. O estudo encontrava-se de acordo com o que está disposto na Resolução nº 466/2012 sobre o cumprimento dos princípios da não maleficência, beneficência, justiça e equidade. Após esclarecimentos sobre o estudo, os responsáveis legais pelos menores de cinco anos que aceitaram participar da pesquisa assinaram, espontaneamente, duas vias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Resultados

A maior parte das crianças brasileiras residem nas regiões Sudeste (39,3%) e Nordeste (27,9%), tinham entre 24 a 59 meses (66,5%), não faziam uso de suplementos com vitamina B12 (92%), e consumiram alimentos fontes de vitamina B12 (95,7%) e folato (80,9) e 1 ou mais grupos de alimentos ultraprocessados (90,6%) no dia anterior a entrevista (**Tabela 1**). A mediana da concentração sérica de vitamina B12 foi 301.8 pmol/L (***Supplemental Table 1***) e de folato foi 38.7 nmol/L (***Supplemental Table 2***).

No Brasil, 14,2% (IC95%: 12,2; 16,1) das crianças entre 6 e 59 meses tinham deficiência de vitamina B12. A prevalência de deficiência de vitamina B12 era maior na região Norte (28,5%; IC95%: 19,1; 38,0), nas crianças de 6 a 23 meses (25,3%; IC95%: 21,9; 28,8), entre os filhos de mães com baixa escolaridade, 0 e 7 anos de estudo, (18,7%; IC95%: 14,7; 22,6), que estavam no primeiro tercil/mais pobres do IEN (18,7%; IC95%: 15,8; 21,7). Crianças que consumiram alguma fonte de vitamina B12 (13%; IC95%: 10,9; 15,1) no dia anterior a realização da coleta de dados tinham prevalências da deficiência de vitamina B12 menores, quando comparadas as crianças que não haviam consumido alimentos fontes (**Tabela 2**).

A prevalência de deficiência de folato é 1,1% no Brasil (dados não apresentados em tabelas). Entre as crianças brasileiras entre 6 e 59 meses, 36,9% (IC95%: 33,4; 40,3) tinham altas concentrações séricas de folato (**Tabela 2**). Entre as macrorregiões, as regiões Nordeste (55,4%; IC95%: 48,1; 62,6) e Norte (36,6%; IC95%: 32,6; 40,6) foram as que apresentaram maiores prevalências, seguida das regiões Sul (31,3%; IC95%: 26,0; 36,7), Sudeste (27,8%; IC95%: 21,1; 34,5) e Centro-Oeste (26,9%; IC95%: 23,5; 30,4). As crianças de 6 a 23 meses tiveram as maiores prevalências (49,8%; IC95%: 45,0; 54,5) de altas concentrações séricas de folato quando comparadas às crianças de 24 a 59 meses (30,4%; IC95%: 26,5; 34,2).

As crianças com altas concentrações séricas de folato apresentaram chance 59% menor (OR: 0,41; IC95%: 0,30; 0,57; $p < 0,001$) de ter deficiência de vitamina B12 quando comparadas com as crianças sem altas concentrações de folato, mesmo após o ajuste para fatores de confundimento (***Supplemental Table 3***).

Discussão

O estudo apresenta três principais resultados. No Brasil, 14,2% das crianças entre 6 e 59 meses tinham deficiência de vitamina B12. As crianças da região Norte do país tinham prevalência 2,9 vezes maior do que aquelas da região Sul. A prevalência de deficiência de vitamina B12 também foi maior em crianças de 6 a 23 meses, (25,3%) e de maior vulnerabilidade socioeconômica (menor escolaridade materna, e menor tercil do IEN). A deficiência de folato é de apenas 1,1%, portanto não deve ser considerado um problema de saúde pública no Brasil. Por outro lado, 36,9% das crianças tinham altas concentrações séricas de folato. As maiores prevalências de altas concentrações séricas de folato foram observadas nas regiões Nordeste (55,4%) e Norte (36,6%) e em crianças entre 6 e 23 meses (49,8%). Por fim, crianças com altas concentrações séricas de folato tiveram chance 59% menor de ser classificadas com deficiência de vitamina B12.

Observamos que a prevalência de deficiência de vitamina B12 em crianças de 6 a 59 meses foi 14,2%, e foi ainda maior em crianças de 6 a 23 meses (25,3%). Outros estudos locais realizados com crianças brasileiras menores de 10 anos observaram que a prevalência de deficiência de vitamina B12 variou de 3,4% em crianças de 6 meses a 10 anos da região Norte a 15% em crianças de 11 a 15 meses da região Norte e Nordeste (CARDOSO et al, 2012; COBAYASHI et al, 2015; GARCIA et al, 2011; SILVA et al, 2019) sendo valores inferiores ao que encontramos em no presente estudo. Três estudos realizados em diferentes países com crianças menores de 24 meses também encontraram prevalências inferiores as observadas no ENANI-2019. Sheng et al. (2019) observaram que 16,7% das crianças chinesas de 6 a 18 meses (SHENG et al, 2019); Strand et al. (2018) documentaram que 15% das crianças nepalesas de 2 a 11 meses (STRAND et al, 2018) e Wong et al. (2022) observaram que 22,5% das crianças guatemaltecas de 6 a 59 meses (WONG et al, 2022) tinham deficiência de vitamina B12. A deficiência de vitamina B12 a longo prazo pode acarretar em atraso no crescimento e desenvolvimento cognitivo (BLACK, 2008; STRAND et al, 2020), podendo comprometer a produtividade futura dessas crianças e a formação de capital humano (UNICEF, 2019).

Mais do que uma em cada quatro crianças (28,5%) que residiam na região Norte do país apresentaram deficiência de vitamina B12, isto é, 2,9 vezes mais do que o observado na região Sul do país (9,7%). É sabido que a deficiência de vitamina B12 é mais prevalente em populações de maior vulnerabilidade social, nas quais o consumo e acesso aos alimentos de origem animal é restrito (ALLEN, 2009; RAMIREZ-VELEZ et al, 2016; TANEJA et al, 2007) com é o caso da região Norte do Brasil, onde ainda são observadas maiores prevalências de carências nutricionais e desnutrição infantil (GARCIA; RONCALLI, 2020). Este resultado mostra a importante desigualdade na deficiência de micronutrientes entre as regiões brasileiras, e reforça que a deficiência de vitamina B12 deve ser incluída na agenda de políticas públicas para esta região.

A prevalência de deficiência de folato é 1,1%, em crianças brasileiras estudadas pelo ENANI-2019. Estes resultados eram esperados e demonstram a efetividade da política pública de fortificação das farinhas de milho e trigo com ferro e ácido fólico no Brasil (BRASIL, 2002). Resultados semelhantes foram observados em outros países da América Latina, que também adotam política de fortificação de alimentos com ácido fólico (BRITO et al, 2015; CUEVAS-NASU et al, 2012; STRAND et al, 2018).

Por outro lado, a prevalência de altas concentrações séricas de folato foi de 36,9% para o Brasil. Silva et al. (2019) encontraram prevalência de altas concentrações séricas de folato de

30,9%, em crianças brasileiras de 11 a 15 meses residentes de cidades brasileiras (Goiânia, Olinda, Rio Branco e Porto Alegre), o que corrobora os resultados encontrados no ENANI-2019 (SILVA et al, 2019). A nossa hipótese é a de que o consumo de alimentos feitos à base de farinhas e fortificados tem crescido, principalmente entre as crianças. Além disso, a prevalência de uso de suplementos multivitamínicos e minerais (54,2%) é alto no Brasil, conforme mostram os dados do ENANI-2019 (BRASIL, 2002; UFEJ, 2022). As elevadas prevalências de altas concentrações séricas de folato e de deficiência de vitamina B12, especialmente nas regiões Nordeste e Norte do país, devem ser destacadas. Estudos têm observado que altas concentrações de folato em indivíduos com baixas concentrações de vitamina B12, pode estar relacionado com efeitos adversos à saúde (MILLER et al, 2009; MORRIS et al, 2007; PAUL; SELHUB, 2017), como por exemplo, obesidade e diabetes em crianças (LAI et al, 2019; YAJNIK et al, 2008).

Observamos que crianças brasileiras de 6 a 59 meses com altas concentrações séricas de folato apresentaram chance 59% menor de serem classificadas com deficiência de vitamina B12. Silva et al (2019) observou que 3% das crianças brasileiras tinham associação inversa entre deficiência de vitamina B12 e altas concentrações de folato ($p < 0,001$) (SILVA et al, 2019).

Podemos citar como limitações do nosso estudo a dificuldade de aceitação de algumas famílias na coleta de sangue, a dificuldade de fazer a punção venosa de forma adequada em alguns domicílios devido a condições de moradia e perda de material devido a hemólise das hemácias (CASTRO et al, 2021). Apesar da perda na coleta, a calibração da amostra e o cálculo do peso amostral levaram em consideração o diferencial de não resposta, assegurando a representatividade da amostra. Como pontos fortes, este estudo é pioneiro ao descrever as prevalências das deficiências de vitaminas B12 e folato em crianças brasileiras de 6 a 59 meses em nível nacional. Além disso, o estudo contou com uma efetiva logística de coleta de amostras e análises laboratoriais, o que é inédito no Brasil (CASTRO et al, 2021). O ENANI-2019 também coletou dados importantes sobre características socioeconômicas e demográficas, e consumo alimentar das crianças brasileiras (UFRJ, 2021), nos permitindo avaliar os principais fatores de confundimento para a associação entre altas concentrações de folato e deficiência de vitamina B12.

Conclusão

Foram observadas elevadas prevalências de deficiência de vitamina B12 e de altas concentrações séricas de folato em crianças brasileiras entre 6 e 59 meses, especialmente na

região Norte do país. Contudo, as altas concentrações de folato se associaram a menor chance de deficiência de vitamina B12. Esse resultado precisa ser explorado em estudos futuros, incluindo a relação com outros biomarcadores do metabolismo de vitamina B12. Além disso, a deficiência de folato não é mais um problema de saúde pública no Brasil. Assim, esses resultados poderão contribuir para a formulação e o redirecionamento de políticas públicas e programas de alimentação, nutrição e saúde voltadas para as crianças brasileiras, quem devem focar em crianças menores de 24 meses em maior vulnerabilidade socioeconômica.

Referências

1. Keating E, Correia-Branco A, Araujo JR, Meireles M, Fernandes R, Guardao L, Guimaraes JT, Martel F, Calhau C. Excess perigestational folic acid exposure induces metabolic dysfunction in post-natal life. J Endocrinol 2015;224(3):245-59. doi: 10.1530/JOE-14-0448.

2. Bailey RL, West KP, Jr., Black RE. The epidemiology of global micronutrient deficiencies. Ann Nutr Metab 2015;66 Suppl 2:22-33. doi: 10.1159/000371618.

3. Darnton-Hill I. Public Health Aspects in the Prevention and Control of Vitamin Deficiencies. Curr Dev Nutr 2019;3(9): n 075. doi: 10.1093/cdn/nzz075.

4. Bahadir A, Reis PG, Erduran E. Oral vitamin B12 treatment is effective for children with nutritional vitamin B12 deficiency. J Paediatr Child Health 2014;50(9):721-5. doi: 10.1111/jpc.12652.

5. Cobayashi F, Tomita LY, Augusto RA, D'Almeida V, Cardoso MA, Team AS. Genetic and environmental factors associated with vitamin B12 status in Amazonian children. Public Health Nutr 2015;18(12):2202-10. doi: 10.1017/S1368980014003061.

6. Allen LH, Miller JW, de Groot L, Rosenberg IH, Smith AD, Refsum H, Raiten DJ. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND): Vitamin B-12 Review. J Nutr 2018;148(suppl_4):1995S-2027S. doi: 10.1093/jn/nxy201.

7. Bailey LB, Stover PJ, McNulty H, Fenech MF, Gregory JF, 3rd, Mills JL, Pfeiffer CM, Fazili Z, Zhang M, Ueland PM, et al. Biomarkers of Nutrition for Development-Folate Review. J Nutr 2015;145(7):1636S-80S. doi: 10.3945/jn.114.206599.

8. Braun KV, Voortman T, Kiefte-de Jong JC, Jaddoe VW, Hofman A, Franco OH, van den Hooven EH. Dietary Intakes of Folic Acid and Methionine in Early Childhood Are Associated with Body Composition at School Age. J Nutr 2015;145(9):2123-9. doi: 10.3945/jn.115.216283.

9. Solomon LR. Advanced age as a risk factor for folate-associated functional cobalamin deficiency. J Am Geriatr Soc 2013;61(4):577-82. doi: 10.1111/jgs.12155.

10. WHO. World Health Organization. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. World Health Organization, 2015.

11. Sheng X, Wang J, Li F, Ouyang F, Ma J. Effects of dietary intervention on vitamin B12 status and cognitive level of 18-month-old toddlers in high-poverty areas: a cluster-randomized controlled trial. BMC Pediatr 2019;19(1):334. doi: 10.1186/s12887-019-1716-z.

12. Jones KM, Ramirez-Zea M, Zuleta C, Allen LH. Prevalent vitamin B-12 deficiency in twelve-month-old Guatemalan infants is predicted by maternal B-12 deficiency and infant diet. J Nutr 2007;137(5):1307-13. doi: 10.1093/jn/137.5.1307.

13. Silva LL, Fawzi WW, Cardoso MA, Group EW. Serum folate and vitamin B12 status in young Brazilian children. Public Health Nutr 2019;22(7):1223-31. doi: 10.1017/S1368980019000193.

14. Cardoso MA, Scopel KK, Muniz PT, Villamor E, Ferreira MU. Underlying factors associated with anemia in Amazonian children: a population-based, cross-sectional study. PLoS One 2012;7(5). doi: 10.1371/journal.pone.0036341.

15. Lander RL, Bailey KB, Lander AG, Alsaleh AA, Costa-Ribeiro HC, Mattos AP, Barreto DL, Houghton LA, Morison IM, Williams SM, et al. Disadvantaged pre-schoolers attending day care in Salvador, Northeast Brazil have a low prevalence of anaemia and micronutrient deficiencies. Public Health Nutr 2014;17(9):1984-92. doi: 10.1017/S1368980013002310.

16. Garcia MT, Granado FS, Cardoso MA. [Complementary feeding and nutritional status of 6-24-month-old children in Acrelandia, Acre State, Western Brazilian Amazon]. Cad Saude Publica 2011;27(2):305-16. doi: 10.1590/s0102-311x2011000200012.

17. Brito A, Mujica-Coopman MF, Lopez de Romana D, Cori H, Allen LH. Folate and Vitamin B12 Status in Latin America and the Caribbean: An Update. Food Nutr Bull 2015;36(2 Suppl): 109-18. doi: 10.1177/0379572115585772.

18. Brasil. RDC Resolution No. 344 of December 13, 2002. In: (Anvisa) MoHMBHRA, ed. Official Federal Gazette (DOU - Diário Oficial da União) - Official Federal Gazette; Executive Power, on December 18, 2002. Brasília, 2002.

19. Bailey RL, Jun S, Murphy L, Green R, Gahche JJ, Dwyer JT, Potischman N, McCabe GP, Miller JW. High folic acid or folate combined with low vitamin B-12 status: potential but inconsistent association with cognitive function in a nationally representative cross-sectional sample of US older adults participating in the NHANES. Am J Clin Nutr 2020;112(6):1547-57. doi: 10.1093/ajcn/nqaa239.

20. Colapinto CK, O'Connor DL, Tremblay MS. Folate status of the population in the Canadian Health Measures Survey. CMAJ 2011;183(2):E100-6. doi: 10.1503/cmaj.100568.

21. Paul L, Selhub J. Interaction between excess folate and low vitamin B12 status. Mol Aspects Med 2017;53:43-7. doi: 10.1016/j.mam.2016.11.004.

22. Smulders YM, Smith DE, Kok RM, Teerlink T, Swinkels DW, Stehouwer CD, Jakobs C. Cellular folate vitamer distribution during and after correction of vitamin B12 deficiency: a case for the methylfolate trap. Br J Haematol 2006;132(5):623-9. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05913.x.

23. Palmer AM, Kamynina E, Field MS, Stover PJ. Folate rescues vitamin B12 depletion-induced inhibition of nuclear thymidylate biosynthesis and genome instability. Proc Natl Acad Sci U S A 2017;114(20):E4095-E102. doi: 10.1073/pnas.1619582114.

24. Selhub J, Miller JW, Troen AM, Mason JB, Jacques PF. Perspective: The High-Folate-Low-Vitamin B-12 Interaction Is a Novel Cause of Vitamin B-12 Depletion with a Specific Etiology-A Hypothesis. Adv Nutr 2022;13(1):16-33. doi: 10.1093/advances/nmab106.

25. Alves-Santos NH, Castro IRR, Anjos LAD, Lacerda EMA, Normando P, Freitas MB, Farias DR, Boccolini CS, Vasconcellos MTL, Silva P, et al. General methodological aspects in

the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. Cad Saude Publica 2021;37(8). doi: 10.1590/0102-311X00300020.

26. Vasconcellos MTL, Silva P, Castro IRR, Boccolini CS, Alves-Santos NH, Kac G. Sampling plan of the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. Cad Saude Publica 2021;37(8):e00037221. doi: 10.1590/0102-311X00037221.

27. Castro IRR, Normando P, Alves-Santos NH, Bezerra FF, Citelli M, Pedrosa LFC, Jordao Junior AA, Lira PIC, Kurscheidt FA, Silva P, et al. Methodological aspects of the micronutrient assessment in the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. Cad Saude Publica 2021;3737(8):e00301120. doi: 10.1590/0102-311X00301120.

28. de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. Food and nutrition bulletin 2008;29(2_suppl1):S238-S44.

29. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. Am J Clin Nutr 2010;91(6):1733-44. doi: 10.3945/ajcn.2009.28671.

30. Anjos LAD, Ferreira HDS, Alves-Santos NH, Freitas MB, Boccolini CS, Lacerda EMA, Castro IRR, Mariz VG, Tavares BM, Gigante DP, et al. Methodological aspects of the anthropometric assessment in the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. Cad Saude Publica 2021;37(8). doi: 10.1590/0102-311X00293320.

31. WHO. World Health Organization. WHO child growth standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-forheight and body mass index-for-age : methods and development., 2006.

32. Barros AJ, Victora CG. [A nationwide wealth score based on the 2000 Brazilian demographic census]. Rev Saude Publica 2005;39(4):523-9. doi: 10.1590/s0034-89102005000400002.

33. Ewerling F, Barros AJ. After 10 years, how do changes in asset ownership affect the Indicador Economico Nacional? Rev Saude Publica 2017;51(0):10. doi: 10.1590/S1518-8787.2017051006517.

34. Monteiro CA, Levy RB, Claro RM, Castro IRRd, Cannon G. A new classification of foods based on the extent and purpose of their processing. Cadernos de saude publica 2010;26(11):2039-49.

35. Cortes TR, Faerstein E, Struchiner CJ. [Use of causal diagrams in Epidemiology: application to a situation with confounding]. Cad Saude Publica 2016;32(8). doi: 10.1590/0102-311X00103115.

36. Strand TA, Ulak M, Kvestad I, Henjum S, Ulvik A, Shrestha M, Thorne-Lyman AL, Ueland PM, Shrestha PS, Chandyo RK. Maternal and infant vitamin B12 status during infancy predict linear growth at 5 years. Pediatr Res 2018;84(5):611-8. doi: 10.1038/s41390-018-0072-2.

37. Wong E, Molina-Cruz R, Rose C, Bailey L, Kauwell GPA, Rosenthal J. Prevalence and Disparities in Folate and Vitamin B12 Deficiency Among Preschool Children in Guatemala. Matern Child Health J 2022;26(1):156-67. doi: 10.1007/s10995-021-03257-6.

38. Black MM. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. Food Nutr Bull 2008;29(2 Suppl): 126-31. doi: 10.1177/15648265080292S117.

39. Strand TA, Ulak M, Hysing M, Ranjitkar S, Kvestad I, Shrestha M, Ueland PM, McCann A, Shrestha PS, Shrestha LS, et al. Effects of vitamin B12 supplementation on neurodevelopment and growth in Nepalese Infants: A randomized controlled trial. PLoS Med 2020;17(12):e1003430. doi: 10.1371/journal.pmed.1003430.

40. Unicef. Situação Mundial da Infância 2019: Crianças, alimentação e nutrição. Sumário Executivo UNICEF Office of Global Insight and Policy 2019;3.

41. Taneja S, Bhandari N, Strand TA, Sommerfelt H, Refsum H, Ueland PM, Schneede J, Bahl R, Bhan MK. Cobalamin and folate status in infants and young children in a low-to-middle income community in India. Am J Clin Nutr 2007;86(5):1302-9. doi: 10.1093/ajcn/86.5.1302.

42. Allen LH. How common is vitamin B-12 deficiency? Am J Clin Nutr 2009;89(2):693S-6S. doi: 10.3945/ajcn.2008.26947A.

43. Ramirez-Velez R, Correa-Bautista JE, Martinez-Torres J, Meneses-Echavez JF, Lobelo F. Vitamin B12 concentration and its association with sociodemographic factors in Colombian children: Findings from the 2010 National Nutrition Survey. Nutrition 2016;32(2):255-9. doi: 10.1016/j.nut.2015.08.019.

44. Garcia LRS, Roncalli AG. Determinantes socioeconômicos e de saúde da desnutrição infantil: uma análise da distribuição espacial. Saude e pesqui(Impr) 2020:595-606.

45. Cuevas-Nasu L, Mundo-Rosas V, Shamah-Levy T, Mendez-Gomez Humaran I, Avila-Arcos MA, Rebollar-Campos Mdel R, Villalpando S. Prevalence of folate and vitamin B12 deficiency in Mexican children aged 1 to 6 years in a population-based survey. Salud Publica Mex 2012;54(2):116-24. doi: 10.1590/s0036-36342012000200007.

46. UFRJ. Federal University of Rio de Janeiro. Use of micronutrient supplements: characterization of the use of micronutrient supplements among Brazilian children under 5 years of age. UFRJ, 2022:130.

47. 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(1):193-200. doi: 10.1093/ajcn/85.1.193.

48. Miller JW, Garrod MG, Allen LH, Haan MN, Green R. Metabolic evidence of vitamin B-12 deficiency, including high homocysteine and methylmalonic acid and low holotranscobalamin, is more pronounced in older adults with elevated plasma folate. Am J Clin Nutr 2009;90(6):1586-92. doi: 10.3945/ajcn.2009.27514.

49. Yajnik CS, Deshpande SS, Jackson AA, Refsum H, Rao S, Fisher DJ, Bhat DS, Naik SS, Coyaji KJ, Joglekar CV, et al. Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. Diabetologia 2008;51(1):29-38. doi: 10.1007/s00125-007-0793-y.

50. Lai JS, Mohamad Ayob MN, Cai S, Quah PL, Gluckman PD, Shek LP, Yap F, Tan KH, Chong YS, Godfrey KM, et al. Maternal plasma vitamin B12 concentrations during pregnancy

and infant cognitive outcomes at 2 years of age. Br J Nutr 2019;121(11):1303-12. doi: 10.1017/S0007114519000746.

51. Karademir F, Suleymanoglu S, Ersen A, Aydinoz S, Gultepe M, Meral C, Ozkaya H, Gocmen I. Vitamin B12, folate, homocysteine and urinary methylmalonic acid levels in infants. J Int Med Res 2007;35(3):384-8. doi: 10.1177/147323000703500313.

52. Bjorke-Monsen AL, Ueland PM. Cobalamin status in children. J Inherit Metab Dis 2011;34(1):111-9. doi: 10.1007/s10545-010-9119-1.

53. UFRJ. Federal University of Rio de Janeiro. Sociodemographic characteristics: demographic, socioeconomic and food security aspects. ENANI-2019. UFRJ, 2021:104

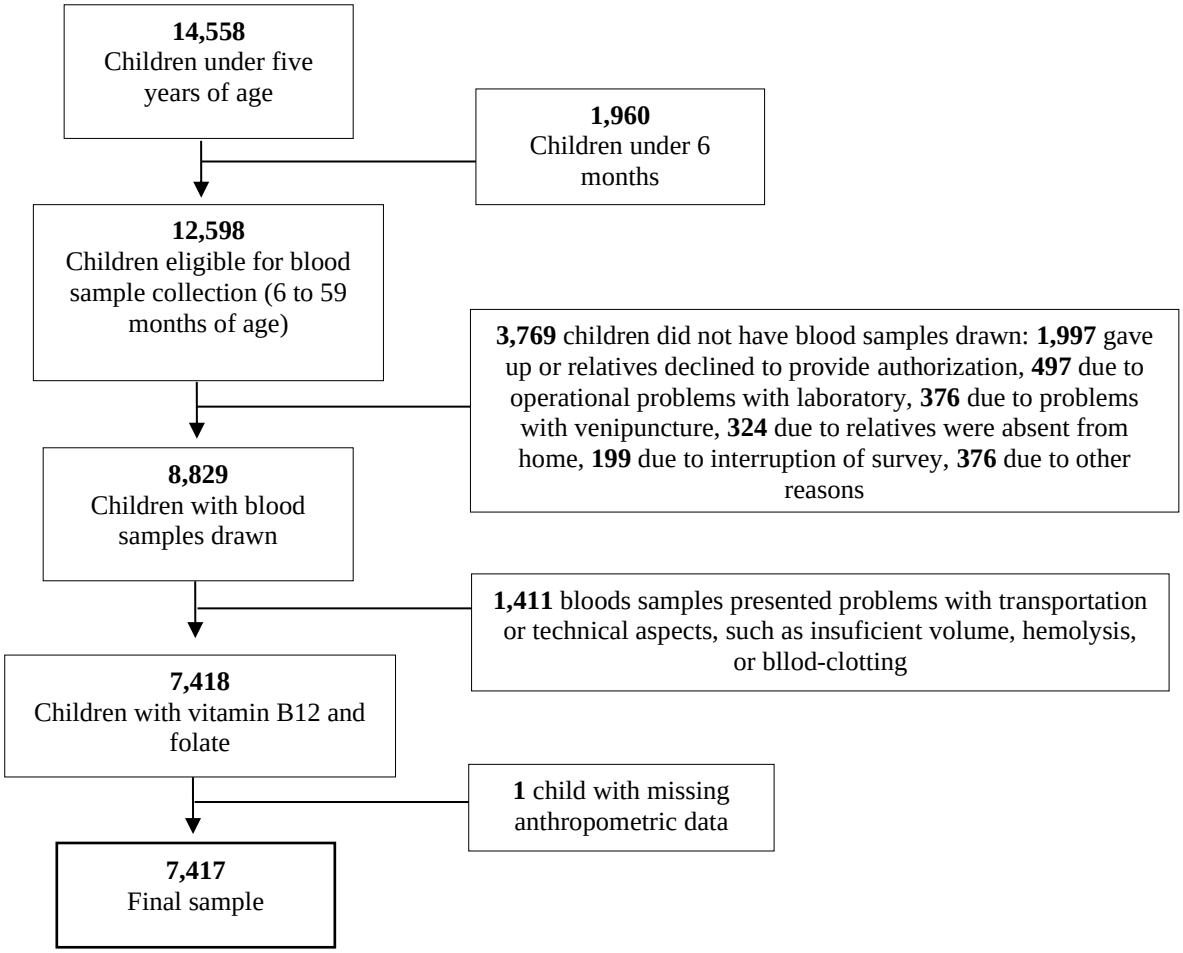
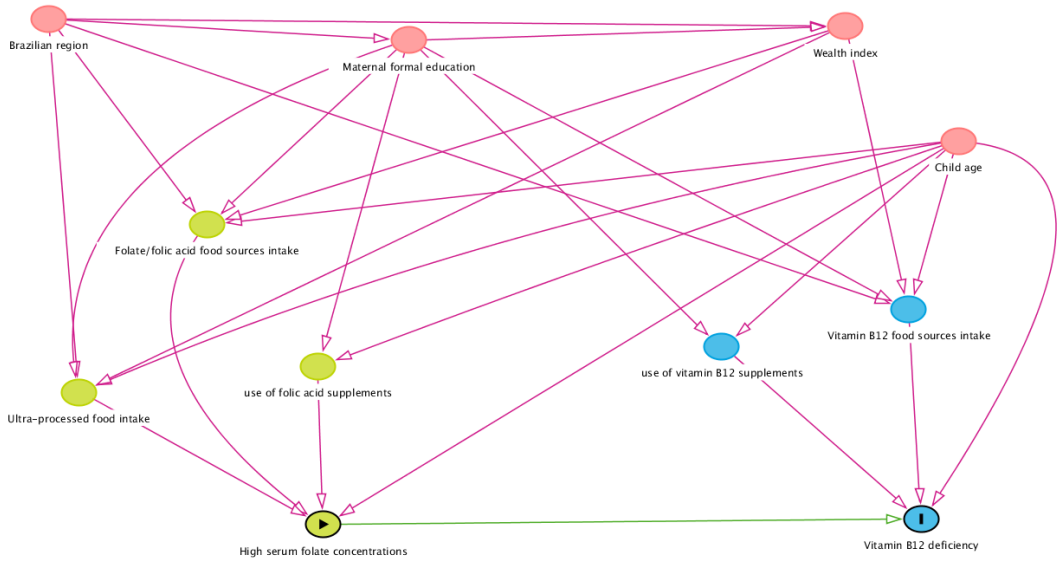


Figure 1. Flowchart of the study sample.



Legend: Exposure; Outcome; Ancestor of exposure; Ancestor of outcome; Ancestor of exposure *and* outcome; Other variable; Causal path; Biasing path.

Supplemental Figure 1. Directed acyclic graph of the theoretical association between high folate concentrations and vitamin B12 deficiency.

Note: Suggested minimal sufficient adjustment set of variables for estimating the total effect of High serum folate concentrations on Vitamin B12 deficiency: child age, food sources intake, Maternal formal education, Ultra-processed food intake.

Table 1. Distribution of the Brazilian children aged 6 to 59 months, according to selected variables. ENANI, 2019.

	Prevalence (%)	95% CI
Brazilian regions		
North	10.9	10.9; 11.0
Northeast	27.9	27.7; 28.2
Southeast	39.3	39.2; 39.5
South	13.5	13.4; 13.5
Mid-West	8.3	8.3; 8.3
Child age (months)		
6-23	33.5	33.4; 33.6
24-59	66.5	66.4; 66.6
Maternal formal education (completed years)		
0-7	24.2	22.0; 26.5
8-10	22.7	20.4; 25.1
11	36.7	34.3; 39.1
≥12	16.3	14.4; 18.2
National wealth index (tertiles)		
1st	32.7	30.3; 35.1
2nd	35.1	32.7; 37.5
3rd	32.2	29.1; 35.2
Use of vitamin B12 supplements[1]		
No	92.0	90.2; 93.7
Yes	8.0	6.3; 9.8
Vitamin B12 food sources intake[2]		
No	4.3	3.3; 5.3
Yes	95.7	94.7; 96.7
Folate food sources intake[2]		
No	19.1	17.2; 21.1
Yes	80.9	78.9; 82.8
Ultra-processed food intake (groups)[2]		
0	9.4	7.9; 10.9
1-2	47.2	43.7; 50.8
≥3	43.4	39.1; 47.6

[1] Use of supplements in the past six months.
[2] refers to food consumption in the day before the interview.
Abbreviation: CI: confidence interval.

Table 2. Prevalence of vitamin B12 deficiency and high serum folate concentrations in Brazilian children aged 6-59 months, according to selected variables. ENANI, 2019.

	Vitamin B12 deficiency[1]		High folate concentrations[2]	
	Prevalence (%)	**95% CI**	**Prevalence (%)**	**95% CI**
Brazil	14.2	12.2; 16.1	36.9	33.4; 40.3
Brazilian regions				
North	28.5	19.1; 38.0	36.6	32.6; 40.6
Northeast	11.8	8.6; 15.0	55.4	48.1; 62.6
Southeast	13.8	10.3; 17.3	27.8	21.1; 34.5
South	9.7	7.2; 12.2	31.3	26.0; 36.7
Mid-West	12.0	9.7; 14.4	26.9	23.5; 30.4
Child age (months)				
6-23	25.3	21.9; 28.8	49.8	45.0; 54.5
24-59	8.5	6.6; 10.5	30.4	26.5; 34.2
Maternal formal education (completed years)				
0-7	18.7	14.7; 22.6	38.3	32.5; 44.1
8-10	15.1	11.2; 19.0	36.5	30.6; 42.4
11	12.7	10.5; 14.9	36.1	31.3; 40.9
≥12	9.3	5.8; 12.9	37.2	31.1; 43.4
National wealth index (tertiles)				
1st	18.7	15.8; 21.7	36.4	33.3; 39.4
2nd	13.4	10.5; 16.3	40.1	34.7; 45.4
3rd	10.3	7.9; 12.7	33.9	27.8; 40.1
Use of vitamin B12 supplements[3]				
No	14.6	12.6; 16.7	36.1	32.8; 39.4
Yes	8.7	4.6; 12.8	45.5	35.1; 55.8
Vitamin B12 food sources intake[4]				
No	40.1	30.6; 49.6	48.5	38.0; 59.1
Yes	13.0	10.9; 15.1	36.4	32.9; 39.8
Folate food sources intake[4]				
No	21.2	16.6; 25.8	31.7	26.6; 36.8
Yes	12.5	10.6; 14.4	38.1	34.7; 41.5
Ultra-processed food intake (groups)[4]				
0	26.7	19.8; 33.7	36.9	27.7; 46.0
1-2	14.7	12.4; 17.0	36.9	32.3; 41.5
≥ 3	10.8	8.3; 13.4	36.9	33.1; 40.7
Vitamin B12 deficiency[1]				
No	-	-	38.7	35.1; 42.3

Yes	-	-	26.1	20.3; 31.9
High folate serum concentrations[2]				
No	16.6	13.8; 19.3	-	-
Yes	10.0	7.9; 12.1	-	-

[1] High = Serum concentrations of folate > 45.3 nmol/L were classified as high folate concentrations
[2] Vitamin B12 deficiency (serum concentrations < 150 pmol/L)
[3] Use of supplements in the past six months.
[4] refers to food consumption in the day before the interview.
Abbreviation: CI: confidence interval.

Supplemental Table 1. Serum vitamin B12 concentrations in Brazilian children aged 6-59 months, according to selected variables. ENANI, 2019.

	Median	IC 95%	1st Quartile	IC 95%	3rd Quartile	IC 95%
Brazil	301.8	287.7; 316.5	198.5	186.7; 209.5	436.0	418.3; 453.0
Brazilian regions						
North	222.1	186.7; 262.7	143.1	123.2; 168.2	330.5	278.9; 413.2
Northeast	278.1	260.4; 298.8	191.8	180.8; 211.0	397.7	370.4; 420.6
Southeast	340.1	301.8; 366.0	218.4	185.9; 242.0	458.9	447.1; 487.7
South	348.2	331.3; 364.5	236.8	225.8; 252.3	475.9	450.8; 506.9
Mid-West	293.6	284.0; 308.4	200.7	191.1; 211.8	409.5	394.0; 439.7
Child age (months)						
6-23	248.6	234.6; 261.2	148.3	135.8; 163.1	384.4	353.4; 414.6
24-59	325.4	312.8; 341.6	229.5	216.2; 239.1	455.2	441.9; 478.8
Maternal formal education (completed years)						
0-7	240.2	220.0; 260.5	173.4	162.3; 186.7	402.8	371.1; 441.2
8-10	220.7	200.4; 250.1	186.7	168.2; 206.6	404.3	369.6; 459.6
11	360.7	340.3; 390.1	212.5	194.8; 233.1	440.5	419.1; 454.5
≥12	160.3	140.4; 180.2	244.2	215.4; 273.7	475.9	455.2; 500.2
National wealth index (tertiles)						
1st	261.9	248.6; 276.7	172.7	162.3; 183.7	385.9	372.6; 400.6
2nd	304.0	282.6; 324.6	205.8	185.9; 225.0	442.7	411.7; 472.2
3rd	344.6	321.7; 366.0	233.1	212.5; 253.1	455.2	444.2; 482.5
Use of vitamin B12 supplements[1]						
No	300.3	287.0; 315.8	197.0	185.9; 209.5	435.3	414.6; 451.5
Yes	315.8	280.4; 346.8	219.9	194.0; 233.9	457.4	408.0; 523.8
Vitamin B12 food sources intake[2]						
No	188.1	153.5; 237.6	112.2	84.1; 137.2	312.8	253.1; 367.4
Yes	306.2	292.9; 320.9	205.1	191.8; 216.9	441.2	420.6; 454.5
Folate food sources intake[2]						
No	278.9	249.4; 297.3	169.0	144.6; 186.7	399.1	366.0; 439.7
Yes	308.4	294.4; 323.2	208.8	197.7; 220.6	441.9	423.5; 456.7
Ultra-processed food intake (groups)[2]						
0	253.1	214.7; 281.8	144.6	115.1; 183.0	371.1	336.4; 429.4
1-2	295.9	281.1; 315.8	190.3	182.2; 205.1	441.9	411.0; 456.7
≥ 3	316.5	298.8; 334.2	222.8	205.1; 235.4	439.0	418.3; 458.9

[1] Use of supplements in the past six months.
[2] refers to food consumption in the day before the interview.
Abbreviation: CI: confidence interval.

Supplemental Table 2. Serum folate concentrations in Brazilian children aged 6-59 months, according to selected variables. ENANI, 2019.

	Median	IC 95%	1st Quartile	IC 95%	3rd Quartile	IC 95%
Brazil	38.7	37.1; 40.5	27.8	26.5; 29.3	47.6	47.6; 53.1
Brazilian regions						
North	39.0	36.7; 41.4	29.7	28.4; 32.1	47.6	47.6; 56.4
Northeast	47.6	47.6; 56.4	34.9	31.9; 38.7	58.9	54.4; 68.0
Southeast	34.2	31.3; 38.1	25.4	21.8; 28.1	47.6	47.6; 56.4
South	36.7	35.3; 39.2	27.4	26.3; 29.2	47.6	47.6; 56.4
Mid-West	34.5	33.0; 35.9	25.1	24.0; 26.8	47.6	47.6; 56.4
Child age (months)						
6-23	45.2	42.7; 47.6	32.4	29.8; 35.5	48.6	47.6; 56.4
24-59	35.6	34.1; 37.8	26.4	25.4; 27.5	47.6	47.6; 52.5
Maternal formal education (completed years)						
0-7	39.0	35.6; 41.8	27.9	25.8; 30.7	47.6	47.6; 54.4
8-10	37.7	34.3; 41.5	26.8	25.2; 29.0	47.6	47.6; 56.4
11	38.6	36.5; 40.9	27.8	26.3; 29.8	47.6	47.6; 56.4
≥12	38.9	37.5; 42.6	29.9	27.0; 32.1	47.6	47.6; 56.4
National wealth index (tertiles)						
1st	39.2	37.6; 40.5	28.0	27.0; 29.2	47.6	47.6; 51.1
2nd	38.6	35.7; 42.4	27.5	26.0; 30.9	47.6	47.6; 56.4
3rd	38.4	35.0; 41.8	27.9	24.3; 30.8	47.6	47.6; 56.4
Use of folate supplements[1]						
No	38.6	37.0; 40.4	27.7	26.4; 29.3	47.6	47.6; 52.8
Yes	40.2	33.5; 47.6	28.8	22.3; 33.5	47.6	47.6; 56.4
Vitamin B12 food sources intake[2]						
No	42.9	41.0; 47.6	32.1	28.3; 39.0	47.6	47.6; 58.9
Yes	38.4	36.6; 40.2	27.6	26.3; 29.2	47.6	47.6; 53.1
Folate food sources intake[2]						
No	36.3	33.3; 39.8	26.8	24.4; 28.7	47.6	47.6; 54.4
Yes	39.0	37.6; 40.9	28.1	26.9; 29.9	47.6	47.6; 53.7
Ultra-processed food intake (groups)[2]						
0	39.3	35.1; 42.9	28.2	24.1; 32.2	47.6	47.6; 56.4
1-2	38.6	36.3; 41.1	27.4	25.8; 29.4	47.6	47.6; 56.4
≥ 3	38.6	36.7; 40.5	28.2	26.6; 30.3	47.6	47.6; 53.7

[1] Use of supplements in the past six months.
[2] refers to food consumption in the day before the interview.
Abbreviation: CI: confidence interval.

Supplemental Table 3. Association between high serum folate concentrations and vitamin B12 deficiency (< 150 pmol/L) in Brazilian children aged 6-59 months. ENANI, 2019.

	Crude model			**Adjusted model[1]**		
	OR	95% CI	*p*[2]	OR	95% CI	*p*[2]
High folate concentrations[3]	0.56	0.41, 0.76	<0.001	0.41	0.30, 0.57	<0.001

Note. The analysis included 7,417 children.

[1] The model was adjusted for child age, folate/ folic acid food sources intake, ultra-processed food intake, and maternal formal education.

[2] p-values refers to logistic regression model

[3] Serum concentrations of folate > 45.3 nmol/L were classified as high folate concentrations

Abbreviations: OR = odds ratio; CI = Confidence interval

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As vitaminas B12 e o folato são vitaminas essenciais para o crescimento e desenvolvimento, já que estão envolvidas em reações metabólicas relacionadas ao funcionamento neurológico adequado e a síntese de DNA, RNA e proteínas, favorecendo a hematopoiese e o crescimento. No entanto, no Brasil há uma escassez de estudos que avaliaram o estado nutricional dessas vitaminas em crianças com representatividade nacional.

Neste estudo, foi observado que a deficiência de vitamina B12 é um problema de saúde pública no Brasil, que atinge 14% das crianças de 6 a 59 meses, sendo mais frequente nas crianças de 6 a 23 meses. As crianças da região Norte do país tinham prevalência 2,9 vezes maior do que aquelas da região Sul. Sendo assim, são necessárias estratégias e políticas de promoção da saúde e de alimentação e nutrição voltadas para mulheres em idade fértil e crianças, que incluam a vitamina B12 como um micronutriente que requer atenção.

Como já esperado, a deficiência de folato não é um problema de saúde pública no Brasil. Apenas 1,1% das crianças brasileiras de 6 a 59 meses apresentaram deficiência de folato. Por outra lado, observamos que 36,8% das crianças tinham altas concentrações séricas deste nutriente, sendo mais prevalente nas crianças da região Norte (55%) e nas crianças de 6 a 23 meses (49,6%).

Ao avaliar a associação entre altas concentrações de folato e a deficiência de vitamina B12, observamos que ter altas concentrações de folato reduzia em 59% a chance de ter deficiência de vitamina B12. Apesar de existirem evidências sugerindo que altas concentrações de folato podem agravar os sinais clínicos e bioquímicos da deficiência de vitamina B12, e que estão relacionados a desfechos desfavoráveis em crianças e idosos, neste estudo está relação não foi observada. Os resultados do estudo sugerem que as altas concentrações de folato diminuíram a chance de deficiência de vitamina B12. É possível que nas crianças, a necessidade de folato esteja aumentada devido à alta demanda metabólica para o crescimento e desenvolvimento. Sendo assim, há a necessidade de mais estudos que busquem avaliar a relação entre altas concentrações de folato e desfechos desfavoráveis em crianças brasileiras.

10. REFERÊNCIAS

ALLEN, L. H. Folate and vitamin B12 status in the Americas. **Nutr Rev,** v. 62, n. 6 Pt 2, p. S29-33; discussion S34, Jun 2004.

_____. How common is vitamin B-12 deficiency? **Am J Clin Nutr,** v. 89, n. 2, p. 693S-6S, Feb 2009.

ALLEN, L. H. et al. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND): Vitamin B-12 Review. **J Nutr,** v. 148, n. suppl_4, p. 1995S-2027S, Dec 1 2018.

ALVES-SANTOS, N. H. et al. General methodological aspects in the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. **Cad Saude Publica,** v. 37, n. 8, p. e00300020, 2021.

ANJOS, L. A. D. et al. Methodological aspects of the anthropometric assessment in the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. **Cad Saude Publica,** v. 37, n. 8, p. e00293320, 2021.

BAHADIR, A.; REIS, P. G.; ERDURAN, E. Oral vitamin B12 treatment is effective for children with nutritional vitamin B12 deficiency. **J Paediatr Child Health,** v. 50, n. 9, p. 721-5, Sep 2014.

BAILEY, L. B.; GREGORY, J. F., 3RD. Folate metabolism and requirements. **J Nutr,** v. 129, n. 4, p. 779-82, Apr 1999.

BAILEY, R. L. et al. High folic acid or folate combined with low vitamin B-12 status: potential but inconsistent association with cognitive function in a nationally representative cross-sectional sample of US older adults participating in the NHANES. **Am J Clin Nutr,** v. 112, n. 6, p. 1547-1557, Dec 10 2020.

BAILEY, R. L.; WEST, K. P., JR.; BLACK, R. E. The epidemiology of global micronutrient deficiencies. **Ann Nutr Metab,** v. 66 Suppl 2, p. 22-33, 2015.

BARROS, A. J.; VICTORA, C. G. A nationwide wealth score based on the 2000 Brazilian demographic census. **Revista de saude publica,** v. 39, p. 523-529, 2005.

BARROS, A. J.; VICTORA, C. G. [A nationwide wealth score based on the 2000 Brazilian demographic census]. **Rev Saude Publica,** v. 39, n. 4, p. 523-9, Aug 2005.

BEHERE, R. V. et al. Maternal Vitamin B12 Status During Pregnancy and Its Association With Outcomes of Pregnancy and Health of the Offspring: A Systematic Review and Implications for Policy in India. **Front Endocrinol (Lausanne),** v. 12, p. 619176, 2021.

BLACK, M. M. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. **Food Nutr Bull,** v. 29, n. 2 Suppl, p. S126-31, Jun 2008.

BLENCOWE, H. et al. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. **Int J Epidemiol,** v. 39 Suppl 1, p. i110-21, Apr 2010.

BRASIL. **Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional-SISVAN**: Ministério da Saúde Brasília 2011.

_____. **Pesquisa Nacional de Amostra por Domicílio. PNAD**. IBGE, I. B. D. G. E. E. 32**:** 134 p. 2012.

_____. **RDC Resolution No. 344 of December 13, 2002**. Official Federal Gazette (D.O.U. - Diário Oficial da União) - Official Federal Gazette; Executive Power, on December 18, 2002. (ANVISA), M. O. H. M. B. H. R. A. Brasília 2002.

BRAUN, K. V. et al. Dietary Intakes of Folic Acid and Methionine in Early Childhood Are Associated with Body Composition at School Age. **J Nutr,** v. 145, n. 9, p. 2123-9, Sep 2015.

BRITO, A. et al. Folate and Vitamin B12 Status in Latin America and the Caribbean: An Update. **Food Nutr Bull,** v. 36, n. 2 Suppl, p. S109-18, Jun 2015.

CARDOSO, M. A. et al. Underlying factors associated with anemia in Amazonian children: a population-based, cross-sectional study. **PLoS One,** v. 7, n. 5, p. e36341, 2012.

CASTRO, I. R. R. et al. Methodological aspects of the micronutrient assessment in the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. **Cad Saude Publica,** v. 3737, n. 8, p. e00301120, 2021.

CENTENO TABLANTE, E. et al. Fortification of wheat and maize flour with folic acid for population health outcomes. **Cochrane Database Syst Rev,** v. 7, p. CD012150, Jul 1 2019.

CHAN, Y. M.; BAILEY, R.; O'CONNOR, D. L. Folate. **Adv Nutr,** v. 4, n. 1, p. 123-5, Jan 1 2013.

COBAYASHI, F. et al. Genetic and environmental factors associated with vitamin B12 status in Amazonian children. **Public Health Nutr,** v. 18, n. 12, p. 2202-10, Aug 2015.

COLAPINTO, C. K. et al. Systematic review of adverse health outcomes associated with high serum or red blood cell folate concentrations. **J Public Health (Oxf),** v. 38, n. 2, p. e84-97, Jun 2016.

COLAPINTO, C. K.; O'CONNOR, D. L.; TREMBLAY, M. S. Folate status of the population in the Canadian Health Measures Survey. **CMAJ,** v. 183, n. 2, p. E100-6, Feb 8 2011.

CORTES, T. R.; FAERSTEIN, E.; STRUCHINER, C. J. [Use of causal diagrams in Epidemiology: application to a situation with confounding]. **Cad Saude Publica,** v. 32, n. 8, p. e00103115, Aug 8 2016.

CUEVAS-NASU, L. et al. Prevalence of folate and vitamin B12 deficiency in Mexican children aged 1 to 6 years in a population-based survey. **Salud Publica Mex,** v. 54, n. 2, p. 116-24, Mar-Apr 2012.

DARNTON-HILL, I. Public Health Aspects in the Prevention and Control of Vitamin Deficiencies. **Curr Dev Nutr,** v. 3, n. 9, p. nzz075, Sep 2019.

DE BENOIST, B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. **Food and nutrition bulletin,** v. 29, n. 2_suppl1, p. S238-S244, 2008.

EBARA, S. Nutritional role of folate. **Congenit Anom (Kyoto),** v. 57, n. 5, p. 138-141, Sep 2017.

EWERLING, F.; BARROS, A. J. After 10 years, how do changes in asset ownership affect the Indicador Economico Nacional? **Rev Saude Publica,** v. 51, n. 0, p. 10, Mar 2 2017.

FIELD, M. S.; STOVER, P. J. Safety of folic acid. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1414, n. 1, p. 59-71, Feb 2018.

GARCIA, L. R. S.; RONCALLI, A. G. Determinantes socioeconômicos e de saúde da desnutrição infantil: uma análise da distribuição espacial. **Saude e pesqui.(Impr.)**, p. 595-606, 2020.

GARCIA, M. T.; GRANADO, F. S.; CARDOSO, M. A. Complementary feeding and nutritional status of 6-24-month-old children in Acrelândia, Acre State, Western Brazilian Amazon. **Cad Saúde Pública,** v. 27, n. 2, p. 305-316, 2011.

GONCALVES, H. et al. Infant nutrition and growth: trends and inequalities in four population-based birth cohorts in Pelotas, Brazil, 1982-2015. **Int J Epidemiol,** v. 48, n. Suppl 1, p. i80-i88, Apr 1 2019.

GROBER, U.; KISTERS, K.; SCHMIDT, J. Neuroenhancement with vitamin B12-underestimated neurological significance. **Nutrients,** v. 5, n. 12, p. 5031-45, Dec 12 2013.

HALDANE, J. On a method of estimating frequencies. **Biometrika,** v. 33, n. 3, p. 222-225, 1945.

UFRJ. Federal University of Rio de Janeiro. **Sociodemographic characteristics: demographic, socioeconomic and food security aspects. ENANI-2019**. UFRJ, p.104 2021

_____. Use of micronutrient supplements: characterization of the use of micronutrient supplements among Brazilian children under 5 years of age. UFRJ, p.130. 2022

JONES, K. M. et al. Prevalent vitamin B-12 deficiency in twelve-month-old Guatemalan infants is predicted by maternal B-12 deficiency and infant diet. **J Nutr,** v. 137, n. 5, p. 1307-13, May 2007.

KEATING, E. et al. Excess perigestational folic acid exposure induces metabolic dysfunction in post-natal life. **J Endocrinol,** v. 224, n. 3, p. 245-59, Mar 2015.

KRISHNAVENI, G. V. et al. Low plasma vitamin B12 in pregnancy is associated with gestational 'diabesity' and later diabetes. **Diabetologia,** v. 52, n. 11, p. 2350-8, Nov 2009.

KRISHNAVENI, G. V. et al. Association between maternal folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in Indian children. **Diabetologia,** v. 57, n. 1, p. 110-21, Jan 2014.

LAI, J. S. et al. Maternal plasma vitamin B12 concentrations during pregnancy and infant cognitive outcomes at 2 years of age. **Br J Nutr,** v. 121, n. 11, p. 1303-1312, Jun 2019.

LANDER, R. L. et al. Disadvantaged pre-schoolers attending day care in Salvador, Northeast Brazil have a low prevalence of anaemia and micronutrient deficiencies. **Public Health Nutr,** v. 17, n. 9, p. 1984-92, Sep 2014.

LI, Z. et al. Folate and vitamin B12 status is associated with insulin resistance and metabolic syndrome in morbid obesity. **Clin Nutr,** v. 37, n. 5, p. 1700-1706, Oct 2018.

MARUVADA, P. et al. Knowledge gaps in understanding the metabolic and clinical effects of excess folates/folic acid: a summary, and perspectives, from an NIH workshop. **Am J Clin Nutr,** v. 112, n. 5, p. 1390-1403, 2020.

MCLEAN, E. D. et al. Low plasma vitamin B-12 in Kenyan school children is highly prevalent and improved by supplemental animal source foods. **J Nutr,** v. 137, n. 3, p. 676-82, Mar 2007.

MILLER, J. W. et al. Metabolic evidence of vitamin B-12 deficiency, including high homocysteine and methylmalonic acid and low holotranscobalamin, is more pronounced in older adults with elevated plasma folate. **Am J Clin Nutr,** v. 90, n. 6, p. 1586-92, Dec 2009.

MILLS, J. L. et al. Do high blood folate concentrations exacerbate metabolic abnormalities in people with low vitamin B-12 status? **Am J Clin Nutr,** v. 94, n. 2, p. 495-500, Aug 2011.

MOEN, G. H. et al. Investigating the causal effect of maternal vitamin B12 and folate levels on offspring birthweight. **Int J Epidemiol,** v. 50, n. 1, p. 179-189, Mar 3 2021.

MONTEIRO, C. A. et al. A new classification of foods based on the extent and purpose of their processing. **Cad saude publica,** v. 26, n. 11, p. 2039-2049, 2010.

MOORE, E. M. et al. Among vitamin B12 deficient older people, high folate levels are associated with worse cognitive function: combined data from three cohorts. **J Alzheimers Dis,** v. 39, n. 3, p. 661-8, 2014.

MORRIS, M. S. et al. 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,** v. 85, n. 1, p. 193-200, Jan 2007.

_____. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. **Am J Clin Nutr,** v. 91, n. 6, p. 1733-44, Jun 2010.

OBEID, R. et al. Vitamin B12 Intake From Animal Foods, Biomarkers, and Health Aspects. **Front Nutr,** v. 6, p. 93, 2019.

PALMER, A. M. et al. Folate rescues vitamin B12 depletion-induced inhibition of nuclear thymidylate biosynthesis and genome instability. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 114, n. 20, p. E4095-E4102, May 16 2017.

PANIZ, C. et al. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. **JBPML,** v. 41, n. 5, p. 323-334, 2005.

PATANWALA, I. et al. Folic acid handling by the human gut: implications for food fortification and supplementation. **Am J Clin Nutr,** v. 100, n. 2, p. 593-9, Aug 2014.

PAUL, L.; SELHUB, J. Interaction between excess folate and low vitamin B12 status. **Mol Aspects Med,** v. 53, p. 43-47, Feb 2017.

PEREIRA, I. et al. Nutritional status of children under 5 years of age in Brazil: evidence of nutritional epidemiological polarisation. **Cien Saude Colet,** v. 22, n. 10, p. 3341-3352, Oct 2017.

PFEIFFER, C. M. et al. Unmetabolized folic acid is detected in nearly all serum samples from US children, adolescents, and adults. **J Nutr,** v. 145, n. 3, p. 520-31, Mar 2015.

RAMIREZ-VELEZ, R. et al. Vitamin B12 concentration and its association with sociodemographic factors in Colombian children: Findings from the 2010 National Nutrition Survey. **Nutrition,** v. 32, n. 2, p. 255-9, Feb 2016.

SCOTT, J. M.; MOLLOY, A. M. The discovery of vitamin B(12). **Ann Nutr Metab,** v. 61, n. 3, p. 239-45, 2012.

SELHUB, J. et al. Perspective: The High-Folate-Low-Vitamin B-12 Interaction Is a Novel Cause of Vitamin B-12 Depletion with a Specific Etiology-A Hypothesis. **Adv Nutr,** v. 13, n. 1, p. 16-33, Feb 1 2022.

SELHUB, J.; MORRIS, M. S.; JACQUES, P. F. In vitamin B12 deficiency, higher serum folate is associated with increased total homocysteine and methylmalonic acid concentrations. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 104, n. 50, p. 19995-20000, Dec 11 2007.

SELHUB, J. et al. Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. **Am J Clin Nutr,** v. 89, n. 2, p. 702S-6S, Feb 2009.

SELHUB, J.; ROSENBERG, I. H. Excessive folic acid intake and relation to adverse health outcome. **Biochimie,** v. 126, p. 71-8, Jul 2016.

SHENG, X. et al. Effects of dietary intervention on vitamin B12 status and cognitive level of 18-month-old toddlers in high-poverty areas: a cluster-randomized controlled trial. **BMC Pediatr,** v. 19, n. 1, p. 334, Sep 13 2019.

SHENG, X. et al. Effects of dietary intervention on vitamin B12 status and cognitive level of 18-month-old toddlers in high-poverty areas: a cluster-randomized controlled trial. **BMC pediatrics,** v. 19, n. 1, p. 1-9, 2019.

SIEKMANN, J. H. et al. Kenyan school children have multiple micronutrient deficiencies, but increased plasma vitamin B-12 is the only detectable micronutrient response to meat or milk supplementation. **J Nutr,** v. 133, n. 11 Suppl 2, p. 3972S-3980S, Nov 2003.

SILVA, L. L. et al. Serum folate and vitamin B12 status in young Brazilian children. **Public Health Nutr,** v. 22, n. 7, p. 1223-1231, May 2019.

SMULDERS, Y. M. et al. Cellular folate vitamer distribution during and after correction of vitamin B12 deficiency: a case for the methylfolate trap. **Br J Haematol,** v. 132, n. 5, p. 623-9, Mar 2006.

SOLOMON, L. R. Advanced age as a risk factor for folate-associated functional cobalamin deficiency. **J Am Geriatr Soc,** v. 61, n. 4, p. 577-82, Apr 2013.

STRAND, T. A. et al. Cobalamin and folate status predicts mental development scores in North Indian children 12-18 mo of age. **Am J Clin Nutr,** v. 97, n. 2, p. 310-7, Feb 2013.

STRAND, T. A. et al. Effects of vitamin B12 supplementation on neurodevelopment and growth in Nepalese Infants: A randomized controlled trial. **PLoS Med,** v. 17, n. 12, p. e1003430, Dec 2020.

STRAND, T. A. et al. Maternal and infant vitamin B12 status during infancy predict linear growth at 5 years. **Pediatr Res,** v. 84, n. 5, p. 611-618, Nov 2018.

SWEENEY, M. R. et al. Evidence of unmetabolised folic acid in cord blood of newborn and serum of 4-day-old infants. **Br J Nutr,** v. 94, n. 5, p. 727-30, Nov 2005.

TANEJA, S. et al. Cobalamin and folate status in infants and young children in a low-to-middle income community in India. **Am J Clin Nutr,** v. 86, n. 5, p. 1302-9, Nov 2007.

UMASANKER, S. et al. Vitamin B12 deficiency in children from Northern India: Time to reconsider nutritional handicaps. **J Family Med Prim Care,** v. 9, n. 9, p. 4985-4991, Sep 2020.

UNICEF. Situação Mundial da Infância 2019: Crianças, alimentação e nutrição. **Sumário Executivo. UNICEF Office of Global Insight and Policy,** v. 3, 2019.

VASCONCELLOS, M.; SILVA, P.; ANJOS, L. Sample design for the Nutrition, Physical Activity and Health Survey (PNAFS), Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. **Estadística,** v. 65, n. 184, p. 47-61, 2013.

VASCONCELLOS, M. T. L. et al. Sampling plan of the Brazilian National Survey on Child Nutrition (ENANI-2019): a population-based household survey. **Cad Saude Publica,** v. 37, n. 8, p. e00037221, 2021.

VASCONCELLOS, M. T. L. D.; SILVA, P. L. D. N.; SZWARCWALD, C. L. Sampling design for the world health survey in Brazil. **Cad Saude Publica,** v. 21, p. S89-S99, 2005.

VENKATRAMANAN, S. et al. Vitamin B-12 and Cognition in Children. **Adv Nutr,** v. 7, n. 5, p. 879-88, Sep 2016.

VILLAMOR, E. et al. Vitamin B-12 status is associated with socioeconomic level and adherence to an animal food dietary pattern in Colombian school children. **J Nutr,** v. 138, n. 7, p. 1391-8, Jul 2008.

WONG, E. et al. Prevalence and Disparities in Folate and Vitamin B12 Deficiency Among Preschool Children in Guatemala. **Matern Child Health J,** v. 26, n. 1, p. 156-167, Jan 2022.

WHO. World Health Organization. **WHO child growth standards : length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-forheight and body mass index-for-age : methods and development.** 2006

_____. **Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations**. World Health Organization. 2015

YAJNIK, C. S. et al. Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. **Diabetologia,** v. 51, n. 1, p. 29-38, 2008.

YAJNIK, C. S. et al. Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. **Diabetologia,** v. 51, n. 1, p. 29-38, Jan 2008.

ZHAO, R.; MATHERLY, L. H.; GOLDMAN, I. D. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. **Expert Rev Mol Med,** v. 11, p. e4, Jan 28 2009.